

---

**Quad-Color-FluoroSpot, das Verfahren zur umfassenden Analyse der  
Kreuzreaktivität DENV-spezifischer B-Zellen auf Einzelzellbasis**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Alexandros Hadjilaou

geboren am 21.11.1988 in Nikosia, Zypern

angefertigt an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig  
Institut für Virologie

Betreuer:

Prof. Dr. med. Christian Jassoy

Mitbetreut von:

Prof. Eva Harris PhD

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 15.08.2017

---

---

## Inhaltsverzeichnis

|   | Seite |
|---|-------|
| 1. Einführung   |       |
| 1.1. Epidemiologie des Denguefiebers                          | 4     |
| 1.2. Klinik des Denguefiebers                                 | 5     |
| 1.3. Das Dengue-Virus (DENV)                                  | 8     |
| 1.4. Der humorale Immunopathomechanismus<br>des Denguefiebers | 9     |
| 1.5. Bestimmung der Kreuzreaktivität                          | 12-16 |
| 1.5.1. Monoklonale Antikörper                                 | 13    |
| 1.5.2. ELISPOT  | 14    |
| 1.5.3. FluoroSpot   | 15    |
| 1.6. Quantenpunkte  | 16    |
| 2. Zielstellung   | 17    |
| 3. Literaturverzeichnis der Einleitung                        | 18    |
| 4. Publikation  | 20    |
| 5. Zusammenfassung  | 27    |
| 6. Selbstständigkeitserklärung                                | 29    |
| 7. Lebenslauf   | 30    |
| 8. Danksagung   | 33    |
| 9. Anlagen  | 35    |

---

## **Bibliografische Beschreibung**

Hadjilaou, Alexandros

Quad-Color-FluoroSpot, das Verfahren zur umfassenden Analyse der Kreuzreaktivität DENV-spezifischer B-Zellen auf Einzelzellbasis

Universität Leipzig, Dissertation

36 S.<sup>1</sup>, 27 Lit.<sup>2</sup>, 8 Abb., 1 Anlage

Referat:

In dieser Promotionsarbeit wird der Quad-Color FluoroSpot (QCF) vorgestellt, welcher die Bestimmung der Frequenz von DENV-Serotyp-spezifischen und DENV-Serotyp-kreuzreaktiven B-Zellen auf Einzelzellbasis ermöglicht. Das vorgestellte Verfahren erlaubt die umfassende Analyse der spezifischen B-Zellantwort, so wie sie sich während einer primären oder sekundären DENV-Infektion bzw. nach einer Dengueimpfung entwickelt. Außerdem ermöglicht der QCF die Beurteilung, ob die DENV-Serotypspezifität bzw. -kreuzreaktivität von B-Zellen als Surrogatmarker für Immunschutz bei DENV-Infizierten bzw. in Studien, welche Dengueimpfstoffkandidaten testen, relevant ist. Außerdem kann das Verfahren durch die Anpassung des verwendeten Antigens auch zur Beurteilung der B-Zellantwort, so wie sie sich nach einer Infektion mit anderen Erregern wie HIV oder Influenzavirus entwickelt, Anwendung finden.

Alexandros Hadjilaou „Quad-Color-FluoroSpot, das Verfahren zur umfassenden Analyse der Kreuzreaktivität DENV-spezifischer B-Zellen auf Einzelzellbasis“

---

<sup>1</sup>Seitenzahl insgesamt

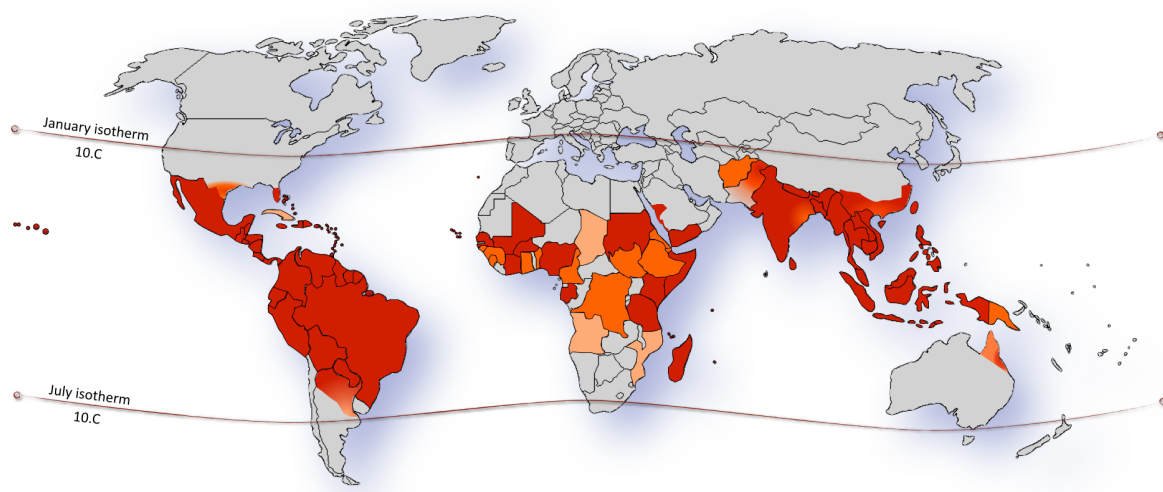
<sup>2</sup>Zahl der im Literaturverzeichnis ausgewiesenen Literaturangabe

## 1. Einführung

### 1.1. Epidemiologie des Denguefiebers

Das Denguefieber (Dengue fever; DF) ist eine seit Jahrtausenden bekannte Infektionskrankheit, deren erste Symptombeschreibung in einer medizinischen Enzyklopädie der Jin-Dynastie (265 bis 420 n.Chr.) zu finden ist<sup>1,2</sup>. Schon früh wurde der Zusammenhang zwischen fliegenden Insekten als Übertragungsglied und stillem, stehendem, sauberem Wasser als Brutplatz für Mückenlarven hergestellt und die Bezeichnung „Wassergift“ eingeführt. Der erstmalig in der englischsprachigen Literatur im Jahre 1827 verwendete Begriff Dengue stammt vom swahilischen „kidenga pepo“, was „plötzlicher, durch einen bösen Geist verursachter, krampfähnlicher Anfall“ bedeutet<sup>1,2</sup>. Im 20. Jahrhundert wurde das Virus als Ursache der Erkrankung identifiziert und die Übertragung durch Mückenstiche endgültig wissenschaftlich nachgewiesen.

Während Afrika oder Asien als Ursprung des primären Vektors, *Aedes aegypti*, in Frage kommen<sup>3,4</sup>, wird seit dem 19. Jahrhundert eine Verbreitung seines Lebensraums an küstennahen Städten infolge der Ausbreitung von Schiffshandelsrouten beobachtet. Das ermöglichte eine langsame aber stetige Ausbreitung der Tigermücke, die ihren Höhepunkt während des zweiten Weltkriegs durch die Benutzung moderner und schneller Transportmittel durch das Militär erreichte<sup>3</sup>. Nach Kriegsende etablierte sich Dengue durch die rasche Urbanisierung und Globalisierung als endemische Infektionskrankheit, was zur Kozirkulation multipler DENV-Serotypen (DENV 1-4) in Endemieregionen wie Südostasien führte, wodurch die Inzidenz des hämorrhagischen Denguefiebers und -schocks zunahm<sup>3,4</sup>.



**Abb.1** Länder und Gebiete, die mit einem hohen Infektionsrisiko und der DENV-Übertragung einhergehen.  
Abbildung basierend auf Angaben von Bhatt S et al. *The global distribution and burden of dengue*

Neuesten Erkenntnissen zufolge werden jährlich weltweit in knapp 130 Ländern ca. 400 Millionen Menschen mit dem DENV infiziert<sup>5</sup>. Während die Mehrheit der Infizierten symptomlos bleibt (ca. 80%), weisen ungefähr 20% der Infizierten (ca. 80 Millionen Fälle) eine klinische Symptomatik auf. Jährlich entwickeln weltweit um die 500 000 der symptomatischen Denguefälle einen schweren klinischen Verlauf, welcher durch eine lebensbedrohliche Blutungsneigung charakterisiert ist. Schätzungen zufolge lebt die Hälfte der Weltbevölkerung in Regionen, die mit einem hohen Infektionsrisiko verbunden sind, wodurch das Denguefieber die weltweit häufigste virale, durch Anthropoden übertragene Infektionskrankheit ist<sup>6</sup> (siehe Abb.1).

## 1.2. Klinik des Denguefiebers

Die Diagnose des Denguefiebers wird besonders in endemischen Gebieten klinisch gestellt und basiert hauptsächlich auf Anamnese und klinischer Untersuchung. Aus diesem Grund sind Maßnahmen wie die Ersteinschätzung in der Notaufnahme und das Entscheidungsmanagement in der primären und sekundären Gesundheitsversorgung ausschlaggebend für den weiteren Krankheitsverlauf und -ausgang des Denguefiebers. Die klinische Symptomatik des Denguefiebers, das aufgrund der mit der Krankheit assoziierten Schmerzen auch Knochenbrecherfieber (eng. breakbone fever) genannt wird, ist zum Teil unspezifisch. Zu den Symptomen zählen:

- Fieber, das biphasisch verlaufen kann,
- Kopfschmerzen, die nicht durch NSARs (nichtsteroidale Antirheumatika wie Azetylsalizylsäure, Ibuprofen, Paracetamol) zu behandeln sind,
- Übelkeit,
- Erbrechen,
- Muskel- und/oder Gelenkschmerzen,
- Leukopenie,
- ein masernähnliches Exanthem.

Die Inkubationszeit beträgt häufig 4-7 Tage, es besteht jedoch ein Inkubationszeitfenster von 3-14 Tagen. Aus diesem Grund ist ein Symptombeginn des Denguefiebers nach mehr als 14 Tagen nach der Rückkehr von Reisenden aus Endemieregionen unwahrscheinlich.

Klinisch-diagnostisch kann ein positiver Rumpel-Leede-Test (eng. tourniquet test), der im aktuellen Algorithmus der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation; WHO) zur Diagnose des Denguefiebers integriert ist<sup>6</sup>, auf eine erhöhte hämorrhagische Diathese hindeuten, die mit dem Denguefieber einhergeht. Dabei wird die Kapillarfragilität untersucht, indem fünf Minuten lang am Oberarm des Patienten mit einer Blutdruckmanschette ein Druck ausgeübt wird, der zwischen den systolischen und diastolischen Werten liegt. Der Test ist positiv, wenn nach fünf Minuten distal der Blutdruckmanschette mehr als 10 bis 20 Petechien pro

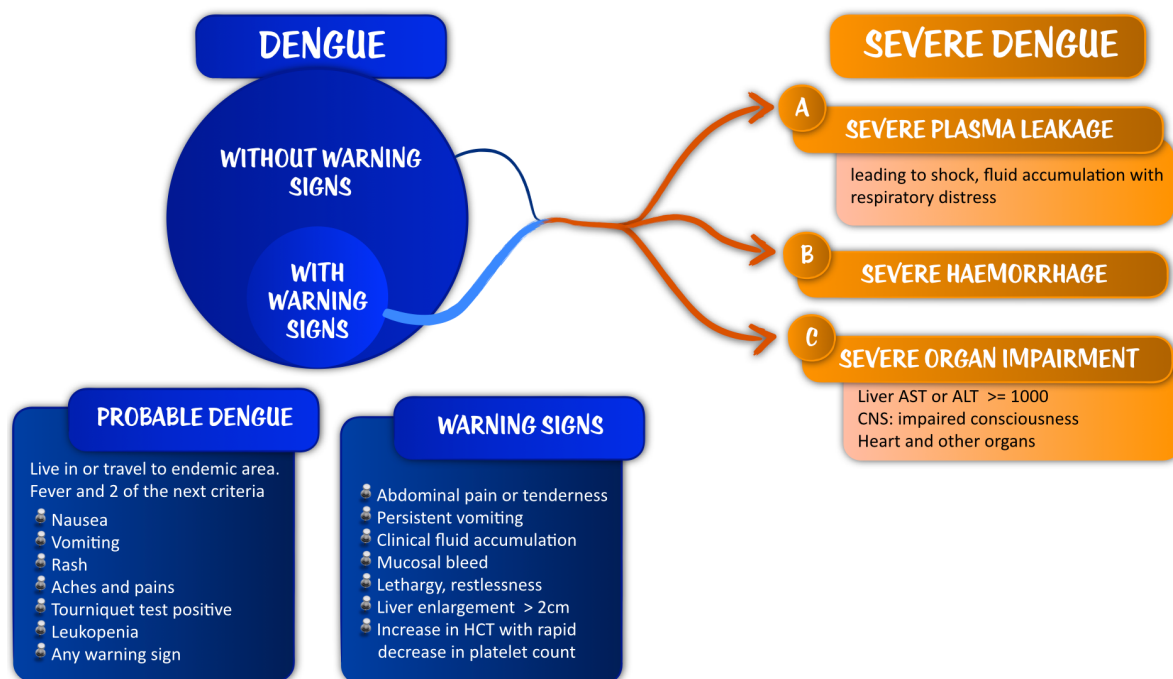
Quadratzoll (entspricht 6,25 Quadratzentimetern) Hautoberfläche entstanden sind. Trotz der leichten Handhabung und Schnelligkeit ist die geringe Spezifität des Tests zu beachten, da eine breite Palette an Ursachen zur erhöhten hämorrhagischen Diathese (z.B. erniedrigte Blutplättchenzahl; Thrombozytopenie) und damit zu einem positiven Ergebnis führen können.

2009 wurde die seit 1997 gültige WHO-Klassifikation aktualisiert, die bis dahin drei Krankheitsbilder bzw. -verläufe einer DENV-Infektion unterschied:

- Denguefieber (DF),
- Dengue-Hämorrhagisches-Fieber (DHF) und
- Dengue-Schock-Syndrom (DSS).

Die aktuelle Klassifikation (siehe Abb.2) zielt auf die Vereinfachung der restriktiven Systematik der älteren ab und unterscheidet zwischen<sup>4</sup>:

- unkompliziertem (uncomplicated Dengue) und
- schwerem Denguefieber (severe Dengue).



**Abb.2** Die aktuelle Dengue-Klassifikation der WHO schlägt eine vereinfachte Einordnung der Klinik des Denguefiebers in Schweregrade vor, welche leichter durchsetzbar zu sein vermag.

Bei ca. 5% der DENV-Infizierten kann es in der Rekonvaleszenz im Anschluss an die milde, selbstlimitierende Symptomatik zu einem schweren klinischen Verlauf kommen<sup>6</sup>. Die Weltgesundheitsorganisation schätzt, dass jeder Zweite, der einen schweren klinischen Verlauf entwickelt, ein höheres Risiko für einen fatalen Ausgang bei unzureichender intensivmedizinischer Betreuung hat. Aus diesem Grund ist die rechtzeitige Erkennung und Selektionierung der Patienten, die in einen schweren

Krankheitsverlauf übergehen, wichtig. Die Beschreibung von Risikofaktoren, die darauf hinweisen können, ist Gegenstand aktueller Forschung. Klinisch sind außerdem Warnzeichen, die den Übergang signalisieren, von Bedeutung. Laborchemisch können ein erhöhter Hämatokrit und eine erniedrigte Thrombozytenzahl hinweisend sein. Weitere klinische Warnzeichen, die diesen Übergang signalisieren können, sind:

- verstärkter bzw. zunehmender Bauchschmerz,
- andauerndes Erbrechen,
- Lebervergrößerung,
- Schleimhautblutungen,
- Trägheit und Unruhe,
- seröse Ergüsse.

Aufgrund seines ähnlichen Übertragungsweges, klinischen Verlaufs und seiner ähnlichen Symptomatik stellt das durch das Chikungunya-Virus (CHIKV) verursachte Fieber eine wichtige Differentialdiagnose für das Denguefieber dar. Interessanterweise ist in der älteren Fachliteratur des 19. Jahrhunderts die Namensverwechslung der klinischen Präsentation von DENV und CHIKV häufig festzustellen, was auf die Ähnlichkeit der durch das DENV und das CHIKV verursachten Infektionskrankheiten zurückzuführen ist<sup>7</sup>. Das Wort „Chikungunya“ stammt aus der Sprache der Makonde bzw. Kimakonde, einem Bantuvolk im Südosten Tansanias, und bedeutet „der gekrümmt Gehende“, was auf den schmerzhaften, schwächenden Gelenkbefall hindeutet, welcher das klinische Bild prägt. Das CHIKV ist ein Alphavirus der Familie der Togaviridae mit einem einzelsträngigen, ca. 11 kb langem RNA-Virusgenom positiver Polarität (+ssRNA) und wird ähnlich wie das DENV auch durch Tigermücken übertragen<sup>8</sup>. Anders als beim DENV, dessen Wirtsspektrum sich auf Primaten beschränkt, ist das Wirtsspektrum des CHIKV breiter und umfasst außer Primaten auch Vögel, Kühe und Nagetiere.

Zur Differentialdiagnose sollten außerdem andere Infektionskrankheiten herangezogen und ausgeschlossen werden, wie:

- Malaria,
- Leptospirose,
- Typhus,
- Influenza,
- Masern und
- durch andere Viren verursachtes hämorrhagisches Fieber.

---

### 1.3. Das Dengue-Virus (DENV)

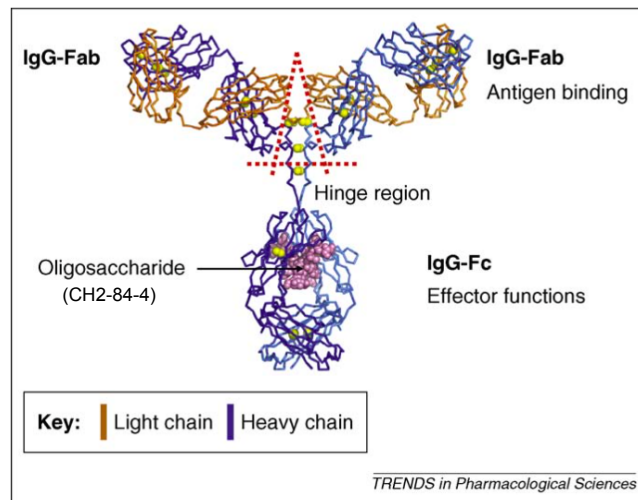
Das Denguefieber ist eine durch den Stich DENV-infizierter Tigermücken (*Aedes aegypti et albopictus*) verursachte Infektionskrankheit. Das Virus besteht aus vier genetisch verwandten, aber trotzdem abgrenzbaren Serotypen (DENV 1-4), die jeweils zur klinischen Ausprägung einer Infektion führen können. Nach der Baltimore-Klassifikation ist das DENV als Klasse-IV-Virus taxonomisch der Familie der Flaviviridae zuzuordnen, deren Mitglieder unter anderem auch das Frühsommer-Meningoenzephalitis- (FSME), das Hepatitis-C- (HCV), das West-Nil- (WNV) und das Gelbfieberevirus (Yellow Fever Virus bzw. YFV) sind. Als Klasse-IV-Virus besitzt das DENV ein einzelstrangiges, ca. 11 kb langes RNA-Virusgenom positiver Polarität (+ssRNA), das für drei strukturelle (C, prM, E) und sieben nicht-strukturelle (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) Proteine kodiert. Das aus einem einzelnen offenen Leserahmen bestehende Virusgenom wird in ein Polyprotein translatiert, das anschließend durch Proteasen in die einzelnen Proteine geschnitten wird.

Die strukturellen Proteine sind für den Aufbau der Viruspartikel notwendig. Während das Kapsid-Protein (C) zur Verpackung des Virusgenoms dient, besteht die Hülle unreifer Dengueviruspartikel aus 180 monomeren Envelope-Glykoproteinen, die als Dimere auf der Virusoberfläche angeordnet sind und aus prM-Glykoproteinen, die auf der Fusionsdomäne der E-Proteine lokalisiert sind. Das Envelope (E) ist ein ca. 53 kDa großes Glykoprotein, das die Penetration und Freisetzung der Viruspartikel koordiniert<sup>9</sup>. Das ca. 23 kDa große Pre-membrane Protein (prM) ist ein Glykoprotein, das die Faltung des E-Glykoproteins erleichtert und die zufällige Fusion oligomerer E-Glykoproteine während des Austritts von Viruspartikeln aus infizierten Zellen verhindert. Für die Reifung der Dengueviruspartikel ist die zelleigene Furin-Serinprotease essentiell, die unter saurem pH im Golgi-Apparat die Spaltung des prM-Proteins und damit die Reifung des Virus katalysiert<sup>10</sup>. Sowohl reife als auch unreife Dengueviruspartikel werden von infizierten Zellen freigesetzt, wobei der Anteil und die Bedeutung reifer und unreifer Partikel während einer Infektion im Menschen Gegenstand aktueller Forschung sind.

Während die strukturellen Proteine für den Aufbau der Viruspartikel notwendig sind, dienen nicht-strukturelle Proteine der Virusreplikation, dem intrazellulären Viruszusammenbau und der Zersetzung der zellulären antiviralen Abwehr. Interessant ist unter diesem Aspekt das nicht-strukturelle Protein NS3, eine Serinprotease, Helikase und RTPase/NTPase. Das aktive Zentrum seiner Proteaseaktivität ist in Anwesenheit des nicht-strukturellen Proteins NS2B proteolytisch aktiv. Der NS2B/3-Komplex spaltet das an der zytoplasmatischen Seite der mitochondrialen Membran lokalisierte MITA/STING, was zu den viralen Mechanismen gehört, welche die angeborene, zelluläre Abwehr durch Interferenz mit der Interferon- $\alpha/\beta$ -Signaltransduktion unterbrechen<sup>11</sup>.



## 1.4. Der humorale Immunopathomechanismus des Denguefiebers



**Abb.3** Die Struktur eines monomeren IgG Antikörpers. Die Y-ähnliche Antikörperstruktur lässt zwei Fab- und ein Fc-Fragment erkennen. Das Fc-Fragment besitzt ein Oligosaccharid (CH2-84.4), die in allen Antikörperklassen zu finden ist.

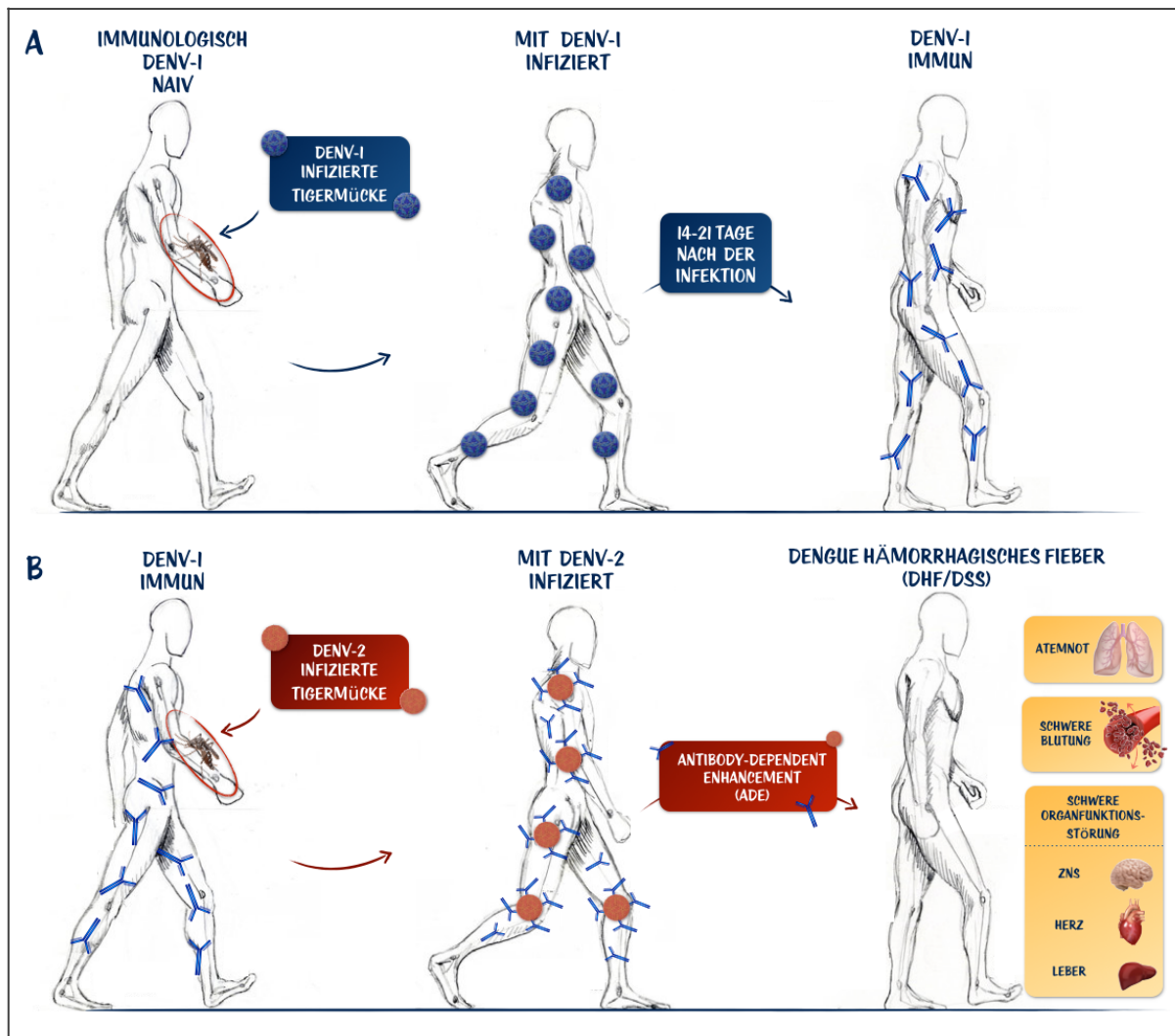
Aus Jefferis R. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action.

jeweils aus einer leichten und einem Teil der schweren Kette aufgebaute antigenbindende Domänen (antigen-binding fragment; Fab-Fragment). Mit dem Fab-Fragment kann der Ak an einem spezifischen Bereich eines Antigens binden, welcher als Epitop bezeichnet wird.

Interessant ist, dass IgG1, 2 und 4 im Gegensatz zu den anderen Immunglobulinisotypen eine einzige, konservierte N-Glykosylierung aufweisen (CH2-84.4), an der sich bis zu 2 kDa große, flexible Oligosaccharide anhängen können<sup>12</sup>. Diese Glykosylierungsstelle wird im Quad-Color-Fluorospot (QCF) benutzt, um Antikörper spezifisch am Fc-Fragment zu konjugieren, was zur Schonung der Antigenbindungsstelle (Fab-Fragment) und zum Erhalt der Funktionalität der Ak führt.

Antikörper werden, als Antwort auf eine DENV-Infektion, von B-Zellen sezerniert und spielen bei der Vermittlung der humoralen Immunität eine zentrale Rolle. Die humorale Immunität umfasst alle nicht-zellulären Abwehrmechanismen, die der Körper zur Verfügung stellt, wie zum Beispiel Komplementfaktoren oder Antikörper. Nach einer primären DENV-Infektion mit einem der vier DENV-Serotypen werden unabhängig davon, ob die Infektion symptomatisch war oder nicht, Antikörper gebildet, welche sich gegen den infizierenden DENV-Serotyp richten, also homotyp sind (siehe Abb. 4A). Die gebildeten Ak sorgen für eine humorale Immunität und eine erneute sekundäre, homotype DENV-Infektion kann durch diese neutralisiert werden. Als neutralisierend werden Ak bezeichnet, welche die biologische Aktivität bzw. Funktion eines Pathogens (z. B. Bakterien oder Viren) hemmen, indem sie zum

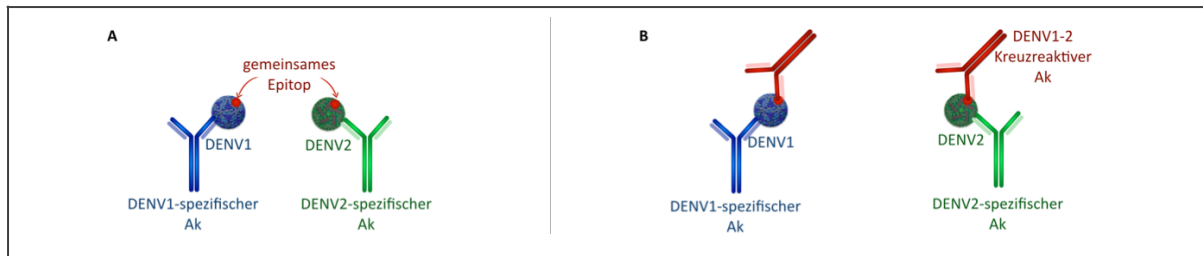
Antikörper (Ak), auch Immunglobuline genannt, sind ca. 150 kDa schwere globuläre Proteine, die anhand ihrer schweren Kette im Menschen in fünf Klassen bzw. Isotypen eingeteilt werden<sup>12</sup>. Die chemische Struktur der Antikörper (siehe Abb.3), die von Edelman und Porter in den 1960er Jahren entschlüsselt wurde, besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind<sup>13,14</sup>. Aus der Y-ähnlichen Antikörperstruktur ergeben sich eine konstante, aus zwei schweren Ketten aufgebaute, immunmodulierende Domäne (crystallizable fragment; Fc-Fragment), und zwei



**Abb.4** Humoraler Immunopathomechanismus des Denguefiebers. Schematische Darstellung einer homotypen (A) und einer heterotypen (B) DENV-Infektion zur Veranschaulichung, wie Antikörper zu einer verstärkten DENV-Infektion führen können (antibody-dependent enhancement; ADE). Für Details siehe Text.

Beispiel die Bindung des Pathogens an der Zelloberfläche verhindern. Damit ist der Zelleintritt blockiert, was besonders für Viren, die obligate Zellparasiten und auf Zellfunktionen angewiesen sind, von besonderer Relevanz ist.

Wie schon erwähnt, besteht das DENV aus vier Serotypen (DENV 1-4). Nach einer primären Infektion werden neben homotypen Antikörpern auch Antikörper gebildet, welche kreuzreaktiv sind, also an Epitope binden, welche auch bei anderen DENV-Serotypen zu finden sind (siehe Abb. 5). Im Falle einer heterotypen DENV-Infektion, d.h. einer zweiten Infektion mit einem anderen DENV-Serotyp als bei der Erstinfektion, können kreuzreaktive Ak zu einem verstärkten Zelleintritt des DENV führen. Diese infektionsverstärkenden Antikörper (eng. antibody-dependent enhancement; ADE) führen zu einer erhöhten Viruslast, was mit einer schweren klinischen Symptomatik korreliert (siehe Abb. 4B).



**Abb.5** Der Unterschied zwischen Spezifität (A) und Kreuzreaktivität (B).

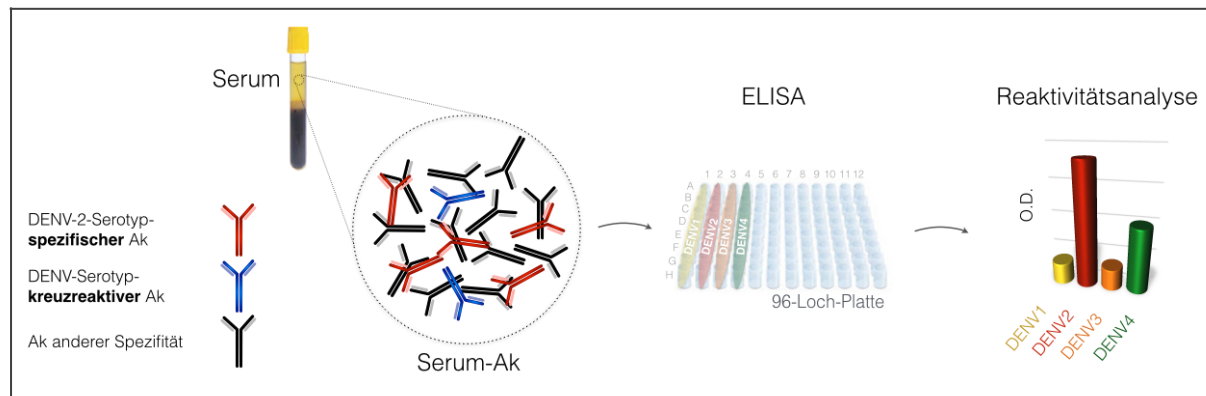
Der ADE-Mechanismus, der 1979 erstmalig beschrieben wurde, kommt häufig *in vitro* vor, während er interessanterweise *in vivo*, mit Ausnahme des DENV, selten vorkommt<sup>15</sup>. Viren benötigen spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, um Zellen bzw. Gewebe infizieren zu können, was als Zelltropismus bezeichnet wird. Auf Zellen können ADE-Antikörper durch die Bindung an Fc-Rezeptoren einen alternativen Zugang in die Zellen ermöglichen, unabhängig davon, ob die Zellen die notwendigen Rezeptoren für den Viruseintritt besitzen. Aus diesem Grund stellt der ADE-Mechanismus neben dem Risiko eines schweren klinischen Verlaufs bei natürlichen DENV-Infektionen auch eine der größten Herausforderungen für die DENV-Impfstoffherstellung dar<sup>16</sup>. Um eine ausreichende Immunität gegen alle vier DENV-Serotypen zu gewährleisten, muss demnach ein potentieller DENV-Impfstoff infektionsverstärkende Antikörper berücksichtigen, was bis jetzt noch nicht gelungen ist<sup>17</sup>.

Auf der Suche nach einem DENV-Impfstoff werden in klinischen Studien Endpunkte, welche die Auswirkungen einer DENV-Infektion bzw. eines DENV-Impfstoffs widerspiegeln, definiert. So ein Endpunkt ist die Verschlechterung eines Krankheitsverlaufes, also der Übergang eines unkomplizierten in ein schweres Denguefieber oder der Schutz vor einer Erkrankung. Ein Surrogatmarker bzw. -endpunkt dient als Ersatz für solch einen Endpunkt und wird als Zwischenresultat verstanden, das im Verlauf eines unkomplizierten Denguefiebers den Übergang in einen schweren klinischen Verlauf möglichst direkt widerspiegelt, zeitlich jedoch viel früher voraussagt oder Prognosen darüber erlaubt, ob eine Person durch die Impfung vor Krankheit geschützt ist.

Zurzeit ist kein Immunkorrelat für Protektion bei einer DENV-Infektion bekannt<sup>18</sup>. Das Kreuzreaktivitätsprofil von DENV-Infizierten bzw. -Geimpften kann ein solcher Surrogatmarker sein. Ein Kreuzreaktivitätsprofil ergibt sich aus der Summe aller im Serum vorhandenen DENV-kreuzreaktiven Ak und der Ak, die in Form von B-Zellrezeptoren auf der B-Zellmembran lokalisiert sind.

## 1.5. Bestimmung der Kreuzreaktivität

Die Bestimmung der Kreuzreaktivität der im Serum vorhandenen Ak kann mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) leicht und schnell erfolgen. Wie in Abb. 6 zu sehen ist, wird nach der Blutentnahme das Serum aus dem Blut einer DENV-infizierten Person gewonnen. Das Serum DENV-infizierter Personen enthält neben Ak anderer Spezifität, die nicht das DENV erkennen, auch eine Mischung aus DENV-Serotyp-spezifischen und DENV-Serotyp-kreuzreaktiven Ak unterschiedlichen Verhältnisses. Anschließend wird jeweils eine Spalte von Vertiefungen einer 96-Loch-ELISA-Platte, wie in Abb. 6 illustriert, mit einem DENV-Serotyp beschichtet. Indem das Serum schrittweise verdünnt wird (eng. serial dilution), kann die maximale Verdünnung identifiziert werden, bei der das Serum noch eine Reaktivität gegen den getesteten DENV-Serotyp aufweist. Dieser auch als Titer bezeichnete Wert kann zwischen den unterschiedlichen DENV-Serotypen in einer Graphik visualisiert werden.



**Abb.6** Schematische Darstellung des praktischen Vorgehens eines Serum-ELISA-Verfahrens. Das getestete Serum entspricht dem einer primären DENV2-infizierten Person. Demnach ist die Mehrheit der DENV-reaktiven Serum-Ak gegen den DENV2-Serotyp gerichtet, was sich in der Reaktivitätsanalyse mit einem höheren Titer für DENV2 widerspiegelt. Trotzdem wird auch eine Reaktivität gegen andere DENV-Serotypen beobachtet. Für Details siehe Text. (O.D.; optische Dichte)

Das erlaubt eine Abbildung der DENV-spezifischen humoralen Immunität des Serums. Trotzdem müssen folgende Punkte bei der Auswertung Serum-ELISA-gewonnener Daten berücksichtigt werden:

1. Die Abb. 5 zeigt den Unterschied zwischen Spezifität und Kreuzreaktivität bezogen auf einzelne Ak. Dagegen sind Serum-Ak eine Mischung solcher einzelner Ak. Die Spezifität und Kreuzreaktivität des gesamten Serums kann demzufolge mittels ELISA als die Summe der im Serum vorhandenen Ak bestimmt werden. Der Anteil von einzelnen, DENV-Serotyp-spezifischen und DENV-Serotyp-kreuzreaktiven Antikörpern ist nicht zu ermitteln.

2. Mittels eines Serum-ELISA wird nicht das gesamte Spektrum an B-Zelltypen untersucht. Obwohl B-Zellen mit der Antikörperproduktion in Verbindung stehen, umfasst der Begriff eine heterogene Gruppe von Zellen, die unterschiedliche Aufgaben und Funktionen haben. Die im Serum vorhandenen Ak zum Beispiel werden durch Plasmazellen sezerniert. Dafür sind bei einer akuten Infektion hauptsächlich die Plasmablasten und die kurzlebigen Plasmazellen zuständig, während die langlebigen Plasmazellen nach der Rekonvaleszenz bzw. nach der akuten Phase einer Infektion (apparent oder inapparent) diese Aufgabe übernehmen. Bei einem Serum-ELISA werden die Ak von B-Gedächtniszellen aufgrund ihrer ruhenden Ak-Produktion nicht getestet, welche aber im Falle einer Neuinfektion durch Aktivierung und Differenzierung zu Plasmablasten bzw. Plasmazellen eine Rolle für eine ausreichende humorale Immunität spielen.

Das hier vorgestellte Verfahren, der **Quad-Color-FluoroSpot**, wurde konzipiert, um neben der DENV-Spezifität von einzelnen B-Zellen auch deren DENV-Kreuzreaktivität bestimmen zu können. Im folgenden Abschnitt dieser Einleitung werden bereits etablierte immunologische Verfahren kurz vorgestellt. Dabei wird besonders aufgezeigt, inwiefern diese für die Beurteilung der DENV-Kreuzreaktivität von einzelnen B-Zellen unzureichend sind. Dennoch haben sie für die Entwicklung des QCF wichtige Anregungen gegeben.

#### 1.5.1. Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper (mAk) werden von einem B-Zellklon, also einer Zelllinie, die sich auf eine einzelne B-Zelle zurückführen lässt, produziert. Dementsprechend sind monoklonale Antikörper gegen ein einzelnes Epitop gerichtet. Zur Herstellung von DENV-spezifischen mAk werden B-Zellen nach der Trennung aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes DENV-infizierter Patienten mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) transformiert und anschließend mit Myelomazellen fusioniert<sup>19-21</sup>.

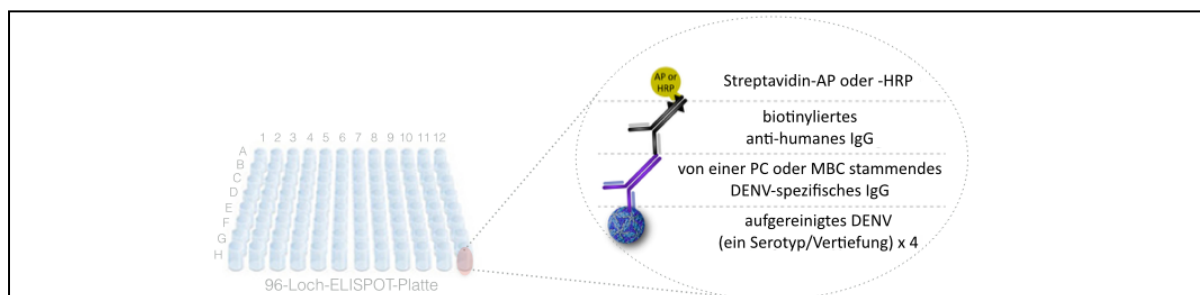
Diese Herangehensweise führt zur Herstellung von mAk, die anschließend mittels ELISA bezüglich ihrer DENV-Spezifität und -Kreuzreaktivität untersucht werden können. Weil ein mAk einem B-Zellklon entstammt, können dadurch Rückschlüsse auf einzelne Antikörper-produzierende Zellen geschlossen werden. Trotzdem kann die Herstellung von mAk aufgrund der niedrigen EBV-Transformationsrate stochastisch sein<sup>19-21</sup>, was auf die geringe Anzahl und die zufällige Auswahl der B-Zellen, die durch die Methode transformiert und folglich immortalisiert werden, hindeutet. Dies kann zu einer Verzerrung führen, da die EBV-transformierte Zellen und die daraus gewonnen monoklonalen Antikörper nicht repräsentativ für das gesamte Spektrum der Antikörper-vermittelten B-Zellimmunität sind.

### 1.5.2. ELISPOT (Enzyme-Linked Immunospot Assay)

Der ELISPOT ist ein immunologisches Verfahren, das zur funktionellen Beurteilung der zellvermittelten Immunität Anwendung findet. Obwohl heutzutage die Mehrheit der diagnostischen ELISPOT-Verfahren die T-Zellimmunität beurteilen (HIV, M. tuberculosis), beschrieb die erste Veröffentlichung zum Thema im Jahre 1983 einen B-Zell-ELISPOT, der durch die Modifizierung des traditionellen ELISA den Nachweis von Antikörper-produzierenden Zellen ermöglichte<sup>22</sup>.

Das Konzept eines DENV-ELISPOT-Verfahrens wird in der Abb.7 dargestellt. Um die Spezifität der B-Gedächtnis- oder Plasmazellen DENV-infizierter Personen zu untersuchen, werden die aus geeignetem Trägermaterial bestehenden Vertiefungen einer 96-Loch-ELISPOT-Platte mit dem jeweiligen DENV-Antigen beschichtet. Als Antigen werden entweder aufgereinigte DENV-Partikel oder rekombinantes E bzw. NS1 verwendet<sup>23</sup>.

Anschließend kann entweder ein Ex-vivo- oder ein In-vitro-ELISPOT durchgeführt werden. Beim Ex-vivo-ELISPOT werden die PBMC DENV-infizierter Personen direkt ausplattiert, was die Untersuchung der Plasmazellen erlaubt. Beim In-vitro-ELISPOT werden die PBMC DENV-infizierter Personen hingegen stimuliert, um die Antikörperproduktion ruhender B-Gedächtniszellen durch Differenzierung in Antikörper-produzierende Zellen anzuregen. Entscheidend für eine ausreichende Stimulation sind die verwendeten Stimulationsmoleküle und der Zeitraum nach der Stimulation. Um die optimalen Bedingungen zu finden, wurden in dieser Arbeit verschiedene Stimulationsmoleküle und unterschiedliche Zeiträume untersucht.



**Abb.7** Schematische Darstellung des DENV-ELISPOT-Verfahrens. DENV, das als Antigen dient, wird von einem Ak gebunden, welcher von B-Zellen sezerniert wurde. Dieser Antigen-spezifische Ak wird mit einem biotinylierten Nachweis-Ak erkannt, was über einen Biotin-Streptavidin-Enzym-Komplex die Visualisierung des Spots ermöglicht. (PC, Plasmazelle; MBC, B-Gedächtniszelle). Für Details siehe Text.

Die DENV-spezifischen, von den B-Zellen produzierten Ak binden an das aufgereinigte DENV und werden anschließend von einem Enzym-konjugierten Antikörper gebunden. In Abhängigkeit von dem verwendeten Enzym, üblicherweise Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase; HRP) oder alkalische Phosphatase



(AP), werden die Spots durch eine entsprechende kolorimetrische Reaktion visualisiert (siehe Abb.7).

Der ELISPOT ist ein Verfahren, das eine sensitive Analyse und Beurteilung der Antikörperspezifität von B-Zellen ermöglicht, welche auf Einzelzellbasis beruht<sup>23-25</sup>. Auf der Suche nach einem Verfahren, das die Kreuzreaktivität von einzelnen B-Zellen erlaubt, ist der ELISPOT hilfreich gewesen.

### 1.5.3. FluoroSpot (Fluorescent ELISPOT)

Der FluoroSpot basiert auf den ELISPOT und erlaubt durch die Einführung von fluoreszierenden Farbstoffen Multiparametertestungen. Die Visualisierung der Spots kann im FluoroSpot durch das *direkte* oder *indirekte* Anfärben der Antigene mit geeigneten Farbstoffen erreicht werden.

Das direkte Anfärben aufgereinigter DENV-Partikel mit organischen Farbstoffen wie AlexaFluor® ist möglich<sup>26</sup>, führte aber im QCF wegen unzureichender Farbtintensität nicht zum gewünschten Ergebnis. Indirektes Anfärben des DENV mit Serotyp-spezifischen Ak kann bei der Anwendung von aufgereinigten DENV-Partikeln zur einer Signalamplifikation führen, weil DENV-Partikel 180 E-Monomere auf der Virusoberfläche tragen. Dadurch können theoretisch pro DENV-Partikel 180 Nachweis-Ak binden, wodurch das Signal amplifiziert wird.

Es hat sich gezeigt, dass auch beim indirekten Anfärben von DENV-Partikeln die Intensität der Spots nicht immer stark genug ist, um deren Visualisierung zu gewährleisten. Um eine ausreichende Spotintensität zu erreichen, war deshalb auch bei der Auswahl der Farbstoffe Sorgfalt geboten. Zu den neuen fluoreszierenden Farbstoffen für biologische Stoffe gehören die Quantenpunkte, die das Quad-Color-Fluorospot zur Bestimmung der Kreuzreaktivität einzelner B-Zellen erst möglich machten.

### 1.6. Quantenpunkte (Quantum dots; Qdots)

Quantenpunkte sind 10-30 nm große Nanokristalle, die aus  $10^2$ - $10^4$  Atomen eines Halbleitermaterials wie Cadmiumselenid (CdSe) zusammengesetzt und trotzdem klein genug sind, um quantenmechanische Eigenschaften zu besitzen<sup>27</sup>. Durch deren Größenänderung und folglich durch die Änderung der Anzahl ihrer Atome können drastische Unterschiede in ihren fluoreszierenden Eigenschaften beobachtet werden. Quantenpunkte sind eine attraktive Alternative zu organischen Farbstoffen wie AlexaFluor®, die unter anderem folgende Vorteile bieten:

- einen hohen Exzitationskoeffizienten, der mit einer hohen Fluoreszenzintensität einhergeht,

- 
- eine hohe Stokes-Verschiebung, die einen großen Wellenlängenabstand zwischen Exzitations- und Emissionswellenlänge ermöglicht,
  - eine außerordentlich hohe Photostabilität und Resistenz gegenüber der Photobleichung, die eine leichtere und längere Lagerung im Vergleich zu organischen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht,

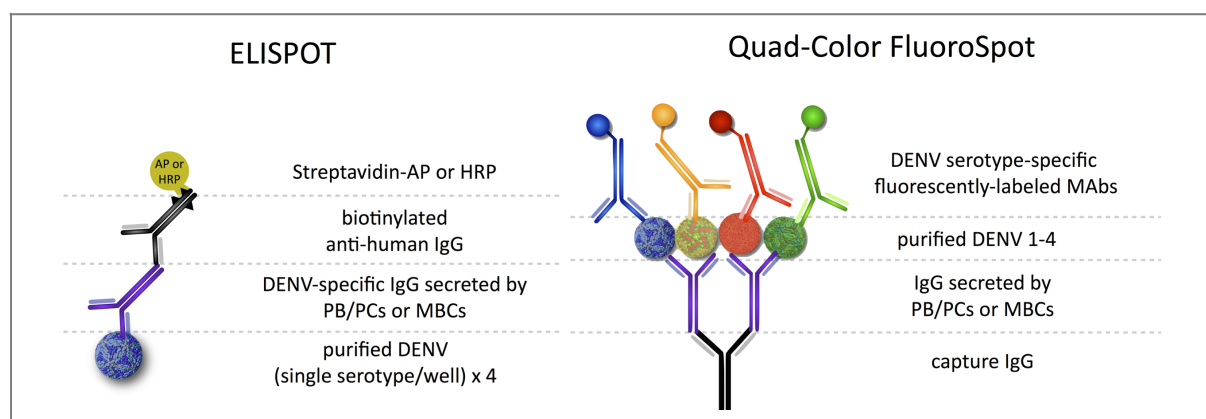


## 2. Zielstellung

Die Bestimmung der DENV-Kreuzreaktivität Antikörper-produzierender Zellen DENV-infizierter Personen war bis dato nicht möglich. In der vorliegenden Promotionsarbeit wird ein innovatives Verfahren vorgestellt, der Quad-Color-FluoroSpot, mit dem Ziel, die umfassende Bestimmung und Analyse der DENV-Kreuzreaktivität von B-Zellen auf Einzelzellbasis zu ermöglichen.

Zur Entwicklung und Verifizierung des QCF trugen folgende Aspekte bei, die zusammenfassend in Abb.8 im Vergleich zum ELISPOT dargestellt werden:

- Als Antigene wurden aufgereinigte DENV-Partikel (DENV1-4) verwendet. Um eine Affinitäts- bzw. Aviditätskonkurrenz auszuschließen, wurden die vier unterschiedlichen Antigene in äquimolarem Verhältnis verwendet.
- DENV-Serotyp-spezifische Ak, die als Nachweis-Ak dienen, wurden gesucht und anhand ihrer Bindungsaffinität und -stärke mittels ELISA ausgewählt.
- Die ausgewählten Ak wurden anschließend an Qdots konjugiert und die Konjugation wurde mittels eines Durchflusszytometers analysiert.
- Eine mögliche Konkurrenz zwischen Nachweis-Ak und aufgereinigten DENV-Partikeln wurde untersucht.
- Im QCF wurden Hybridomzellen und EBV-transformierte B-Zellen bekannter Spezifität als Antikörper-produzierende Zellen verwendet, um die Aussagekraft des QCF-Verfahrens bezüglich der Spezifität **und** Kreuzreaktivität einzelner B-Zellen zu bestätigen.
- Der QCF wurde zur Analyse der Kreuzreaktivität von B-Zellen DENV-infizierter Patienten, sowohl im Ex-vivo- als auch im In-vitro-Format eingesetzt.



**Abb.8** Schematische Darstellung und Vergleich des ELISPOT- und des Quad-Color-FluoroSpot-Verfahrens (QCF). Aufgrund seines experimentellen Aufbaus erlaubt der ELISPOT nur die Analyse der DENV-Spezifität von B-Zellen. Im Gegensatz dazu erlaubt das QCF-Format die Analyse der DENV-Kreuzreaktivität.

Aus Hadjilaou A et al. Single-Cell Analysis of B Cell/Antibody Cross-Reactivity Using a Novel Multicolor FluoroSpot Assay.

### 3. Literaturverzeichnis der Einleitung

1. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480-496.
2. Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ.* 1980;58(1):1-21.
3. Wilder-Smith A, Gubler DJ. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med Clin North Am.* 2008;92(6):1377-90-x. doi:10.1016/j.mcna.2008.07.002.
4. WHO. *Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever.* July 2011:1-212.
5. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504-507. doi:10.1038/nature12060.
6. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition.* 2009.
7. Carey DE. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci.* 1971;26(3):243-262.
8. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med.* 2015;372(13):1231-1239. doi:10.1056/NEJMra1406035.
9. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature.* 2004;427(6972):313-319. doi:10.1038/nature02165.
10. Pierson TC, Diamond MS. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr Opin Virol.* 2012;2(2):168-175. doi:10.1016/j.coviro.2012.02.011.
11. Yu C-Y, Chang T-H, Liang J-J, et al. Dengue virus targets the adaptor protein MITA to subvert host innate immunity. *Diamond MS, ed. PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002780. doi:10.1371/journal.ppat.1002780.
12. Jefferis R. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(7):356-362. doi:10.1016/j.tips.2009.04.007.
13. Edelman GM, Benacerraf B, Ovary Z, Poulik MD. Structural differences among antibodies of different specificities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1961;47(11):1751-1758.
14. Porter RR. Separation and isolation of fractions of rabbit gamma-globulin containing the antibody and antigenic combining sites. *Nature.* 1958;182(4636):670-671.
15. Halstead SB. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis.* 1979;140(4):527-533.
16. Flipse J, Smit JM. The Complexity of a Dengue Vaccine: A Review of the Human Antibody Response. *Simmons CP, ed. PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(6):e0003749. doi:10.1371/journal.pntd.0003749.
17. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet.* 2012;380(9853):1559-1567. doi:10.1016/S0140-6736(12)61428-7.
18. Thomas SJ. The necessity and quandaries of dengue vaccine development. *J Infect Dis.* 2011;203(3):299-303. doi:10.1093/infdis/jiq060.
19. Teoh EP, Kukkaro P, Teo EW, et al. The structural basis for serotype-specific neutralization of dengue virus by a human antibody. *Sci Transl Med.* 2012;4(139):139ra83-139ra83. doi:10.1126/scitranslmed.3003888.
20. Smith SA, Zhou Y, Olivarez NP, Broadwater AH, de Silva AM, Crowe JE. Persistence of circulating memory B cell clones with potential for dengue virus disease enhancement for decades following infection. *J Virol.* 2012;86(5):2665-2675. doi:10.1128/JVI.06335-11.
21. Beltramello M, Williams KL, Simmons CP, et al. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe.* 2010;8(3):271-283. doi:10.1016/j.chom.2010.08.007.
22. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):109-121.

23. Mathew A, West K, Kalayanarooj S, et al. B-cell responses during primary and secondary dengue virus infections in humans. *J Infect Dis.* 2011;204(10):1514-1522. doi:10.1093/infdis/jir607.
24. Wrammert J, Onlamoon N, Akondy RS, et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans. *J Virol.* 2012;86(6):2911-2918. doi: 10.1128/JVI.06075-11.
25. Zompi S, Santich BH, Beatty PR, Harris E. Protection from secondary dengue virus infection in a mouse model reveals the role of serotype cross-reactive B and T cells. *J Immunol.* 2012;188(1):404-416. doi:10.4049/jimmunol.1102124.
26. Zhang SL-X, Tan H-C, Hanson BJ, Ooi EE. A simple method for Alexa Fluor dye labelling of dengue virus. *J Virol Methods.* 2010;167(2):172-177. doi:10.1016/j.jviromet.2010.04.001.
27. Esteve-Turrillas FA, Abad-Fuentes A. Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes. *Biosens Bioelectron.* 2013;41:12-29. doi:10.1016/j.bios.2012.09.025.

# Single-Cell Analysis of B Cell/Antibody Cross-Reactivity Using a Novel Multicolor FluoroSpot Assay

Alexandros Hadjilaou,<sup>1</sup> Angela M. Green, Josefina Coloma, and Eva Harris

Dengue is a major public health problem globally. It is caused by four antigenically distinct serotypes of dengue virus (DENV1–4), and although serotype-specific and strongly neutralizing cross-reactive immune responses against the four DENV serotypes are thought to be protective, subneutralizing Abs can contribute to increased disease severity upon secondary infection with a different DENV serotype. Understanding the breadth of the immune response in natural DENV infections and in vaccinees is crucial for determining the correlates of protection or disease severity. Transformation of B cell populations to generate mAbs and ELISPOT assays have been used to determine B cell and Ab specificity to DENV; however, both methods have technical limitations. We therefore modified the conventional ELISPOT to develop a Quad-Color FluoroSpot to provide a means of examining B cell/Ab serotype specificity and cross-reactivity on a single-cell basis. Abs secreted by B cells are captured by an Fc-specific Ab on a filter plate. Subsequently, standardized concentrations of all four DENV serotypes are added to allow equal stoichiometry for Ag binding. After washing, the spots, representing individual B cells, are visualized using four fluorescently labeled DENV serotype-specific detection mAbs. This method can be used to better understand the breadth and magnitude of B cell responses following primary and secondary DENV infection or vaccination and their role as immune correlates of protection from subsequent DENV infections. Furthermore, the Quad-Color FluoroSpot assay can be applied to other diseases caused by multiple pathogen serotypes in which determining the serotype or subtype-specific B cell response is important. *The Journal of Immunology*, 2015, 195: 000–000.

Half of the global population is at risk for dengue, a mosquito-borne disease caused by four distinct virus serotypes (DENV1–4) (1). Infection with one DENV serotype confers protection from disease upon reinfection with the same serotype, but the immune response can contribute to either protection or increased disease severity upon infection with other serotypes (2). After a primary DENV infection, although cross-reactive Abs predominate, neutralizing Abs are mostly type specific (3). In secondary DENV infections, type-specific Abs derived from primary memory B cells (MBCs) are maintained, but cross-reactive Abs are induced at higher titers and can be strongly neutralizing (4–7). With respect to B cells, secondary DENV infection results in a dramatic plasmablast (PB) expansion in peripheral blood (8, 9). Serotype-specific B cells are more frequent after primary DENV infection, whereas after secondary infection, serotype cross-reactive B cells predominate, with greater reactivity to previously infecting DENV serotypes (10, 11). Dissecting Ab and B cell serotype specificity and cross-reactivity is essential

for understanding protective immunity against DENV resulting from natural infections and candidate vaccines.

Human DENV-specific B cells have been studied by generation of B cell clones and mAbs and by ELISPOT. EBV transformation of B cells isolated from dengue patient PBMCs and fusion with myeloma cells or recombinant expression of mAbs generated from DENV-reactive PB/plasma cells (PCs) has enabled the analysis of the DENV serotype cross-reactivity of single MBCs or PB/PCs (3–5, 7, 12). Although this approach provides information about cross-reactivity on a single-cell basis, generation of mAbs can be stochastic due to low EBV transformation and fusion efficiency (4, 5, 13) and potential bias in the selection process of EBV transformation or to limitations in sorting DENV-specific B cells and in Ab sequencing, cloning, and expression. Thus, the resulting clones and mAbs may not be representative of the entire breadth of the B cell response. Conventional ELISPOT has been used to characterize both MBC and PB/PC responses after DENV infection (8–11). However, because the serotype specificity is dictated by the Ag coating each well, this approach can only determine B cell specificity at the population level. Recent advances in ELISPOT readers and fluorescent probe technology permit improved detection of Ag specificity using fluorescently labeled Abs. We have incorporated these innovations into a new dengue Quad-Color FluoroSpot (QCF) assay to enable single cell-based analysis of B cell serotype cross-reactivity in DENV-infected individuals.

## Materials and Methods

### DENV propagation and purification

*Aedes albopictus* C6/36 cells were infected with the four DENV serotypes at a multiplicity of infection of 0.01 in RPMI 1640 supplemented with 2% FBS (Life Technologies), 1% penicillin/streptomycin, and 1% HEPES. Cellular supernatant was collected 5–8 d postinfection and concentrated using 100-kDa Amicon filter units (Millipore) by centrifuging at  $3250 \times g$  for 20 min at 4°C. The concentrated supernatant containing the virus was layered on a discontinuous 20/55% OptiPrep (Sigma-Aldrich) density gradient and ultracentrifuged at 40,000 rpm for 2 h at 4°C, without the brake, using a SW41Ti rotor. DENV layered between the 20 and 55%

Division of Infectious Diseases and Vaccinology, School of Public Health, University of California, Berkeley, Berkeley, CA 94720

<sup>1</sup>Current address: Faculty of Medicine, Institute of Virology, University of Leipzig, Leipzig, Germany.

Received for publication April 20, 2015. Accepted for publication July 28, 2015.

This work was supported in part by the Fighting Infections through Research, Science and Technology grant from the Bill and Melinda Gates Foundation and by the Instituto Carlos Slim de la Salud (to E.H. and J.C.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Eva Harris, Division of Infectious Diseases and Vaccinology, School of Public Health, University of California, Berkeley, 185 Li Ka Shing Center, 1951 Oxford Street, Berkeley, CA 94720-3370. E-mail: eharris@berkeley.edu

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: ASC, Ab-secreting cell; BCA, biconchonic acid; DENV, dengue virus; E, envelope; MBC, memory B cell; PB, plasmablast; PBS-T, PBS-0.05% Tween; PC, plasma cell; QCF, Quad-Color FluoroSpot; Qdot, quantum dot.

Copyright © 2015 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/15/\$25.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1500918

gradients was collected and tested by RT-PCR (11) and SDS-PAGE (see below) for serotype specificity and protein purity, respectively.

#### mAb production and purification

Three of the mAbs used for detection are of mouse origin (anti-DENV1 E95, anti-DENV2 E96, and anti-DENV4 E88) and were obtained from M. Diamond (Washington University in St. Louis). One human detection mAb (anti-DENV3 5J7) was obtained from J. Crowe (Vanderbilt University). Murine hybridomas secreting mAbs used for detection in the QCF assay were propagated in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, and 1% HEPES, adapted to serum-free medium (Hybridoma-SFM; Life Technologies), and transferred to CELLLine dual-chamber bioreactors (Integra Biosciences). Supernatant containing the secreted mAbs was collected every 7 d and purified using agarose beads coated with protein G (UltraLink; Pierce) according to the manufacturer's instructions. mAbs were resuspended in Tris buffer (pH 7.4) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . mAb purity and DENV serotype specificity were tested by SDS-PAGE and ELISA, respectively.

#### SDS-PAGE to confirm DENV and mAb purity

Purified DENV or purified mAbs were denatured in  $5\times$  SDS loading buffer (0.25 mol Tris-HCl [pH 6.8], 0.25% bromophenol blue, 0.5 mol DTT, 10% SDS, and 50% glycerol) at  $96^{\circ}\text{C}$  for 15 min. For mAbs, 12  $\mu\text{L}$  denatured samples was loaded on a 12% precast SDS-PAGE gel (Bio-Rad) and run at 100 V for 30–60 min. For DENV, 5  $\mu\text{g}$  DENV/well was loaded on a precast 4–20% gel (Bio-Rad) and run for 2 h at 60 V. Gels were then stained with Coomassie brilliant blue staining solution (Coomassie brilliant blue dissolved in 50% methanol, 10% glacial acetic acid, and 40%  $\text{H}_2\text{O}$ ) for 10–15 min. Subsequently, gels were destained for 20–50 min using a destaining solution (50% methanol, 10% glacial acetic acid, and 40%  $\text{H}_2\text{O}$ ) until the protein bands were visible.

#### Characterization of detection mAbs by ELISA

A qualitative ELISA was used to assess the serotype specificity of the detection mAbs (anti-DENV1 E95, anti-DENV2 E96, anti-DENV3 5J7, and anti-DENV4 E88) prior to quantum dot (Qdot) conjugation (Qdot 565, 705, 625, and 525, respectively). Briefly, plates were coated with a 1:100 dilution of the OptiPrep-purified DENV in coating buffer at  $37^{\circ}\text{C}$  for 2 h. After three

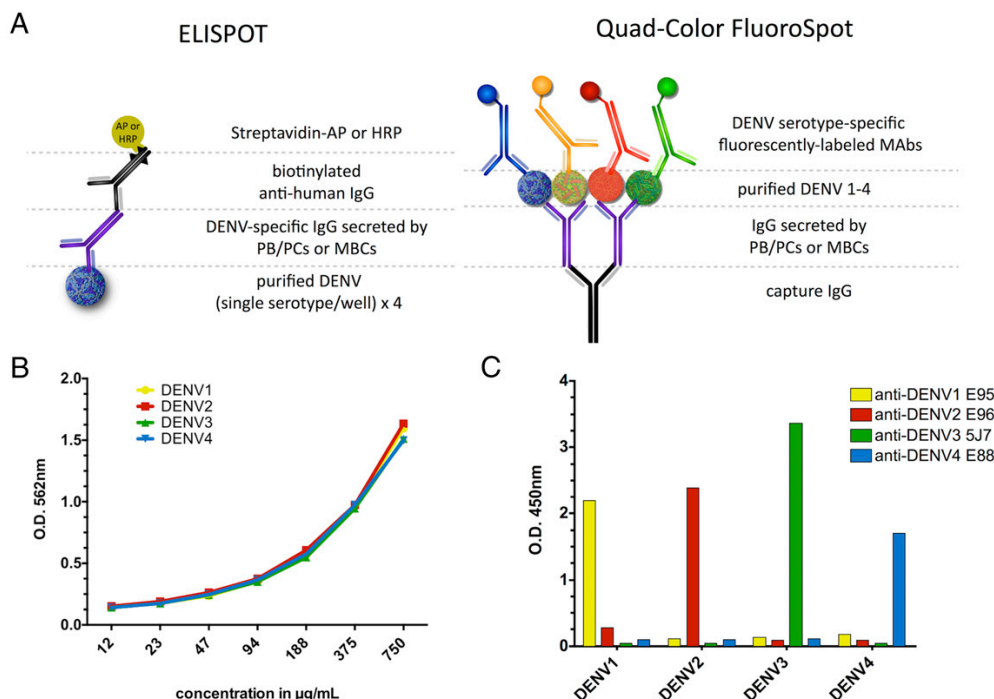
washes with PBS-0.05% Tween (PBS-T), plates were blocked with blocking buffer (5% milk in PBS-T) for 2 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Detection mAbs were incubated with the primary Ab at a 1:1000 dilution in blocking buffer at  $37^{\circ}\text{C}$  for 2 h. After three washes with PBS-T, the plates were incubated with either anti-human-HRP or anti-mouse-HRP secondary Ab depending on the origin of the primary Ab (human versus mouse) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 2 h. Plates were then washed three times with PBS-T and developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich).

#### Conjugation of mAbs to Qdots

Purified mAbs (100  $\mu\text{g}$ ) were conjugated enzymatically to Qdots (Live Technologies) via the *N*-acetylglucosamine of the glycosylation chain on the Fc region of the mAb after hydrolysis of a galactose residue. SiteClick technology (Invitrogen) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, after the Tris buffer was exchanged with the Ab preparation buffer, galactosidase was used to cleave the galactose residue on the glycosylation chain, leaving the *N*-acetylglucosamine exposed. Subsequently,  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase was used to attach an azide group (*N*-azidoacetylglactosamine) to the cleaved galactose moiety. Microcentrifugal filter units (m.w. cutoff 50 kDa) were used to purify the azide-modified mAbs from the enzymes, and the mAbs were incubated with dibenzocyclooctynol-modified Qdots overnight at room temperature. The conjugated mAbs were then ready for use. For Qdots 625 and 700, the manufacturer offers a microcentrifugal filter of 300 kDa to remove unconjugated Qdots and mAbs.

#### Confirmation of conjugation efficiency by flow cytometry

Flow cytometry was used to test the conjugation efficiency of the detection mAbs. For this purpose, Raji cells stably transfected to express dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin were infected with each of the DENV serotypes separately in infection media (RPMI 1640 supplemented with 2% FBS, 1% penicillin/streptomycin, and 1% HEPES) for 48 h. Cells were then centrifuged and washed with FACS buffer ( $1\times$  PBS, 0.5% BSA, and 0.02% sodium azide). Washed cells were then fixed with 2% paraformaldehyde for 30 min and permeabilized for 10 min with 0.05% saponin. Qdot-conjugated detection mAbs were incubated with the cells for 30 min at 1:100 in permeabilization buffer containing 1% normal mouse or human sera. After the incubation, three



**FIGURE 1.** Development of the QCF. **(A)** Schematic comparison of ELISPOT and QCF. **(B)** Standardization of Ag concentration. The concentration of the four purified DENV serotypes (DENV1 N1265-04, DENV2 N172-06, DENV3 N2845.6-09, and DENV4 N703-99) was standardized by protein concentration as determined by BCA. Shown is a BCA dilution curve with equal amounts of each purified DENV serotype. **(C)** Detection mAb specificity. DENV serotype-specific detection mAbs were tested for their reactivity against the purified DENV virions via ELISA. AP, alkaline phosphatase.

washes with permeabilization buffer and two washes with FACS buffer were performed. Samples were analyzed on a BD LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). Analysis was performed using FlowJo 8.8.7 software (Tree Star).

#### Quad-Color FluoroSpot

The membrane of a sterile IPFL clear 96-well plate (Millipore) was activated with 50  $\mu$ l/well 70% ethanol for 2 min. After three washes with PBS, the plates were incubated with 2  $\mu$ g/well Fc $\gamma$  fragment-specific anti-human IgG (The Jackson Laboratory) overnight at 4°C. Wells were blocked with 200  $\mu$ l RPMI 1640 supplemented with 10% FBS for 2 h at 37°C after the wells were washed three times with PBS. Human hybridomas, EBV-transformed B cells, or activated PBMCs from DENV-positive or -negative individuals were counted and plated in a total of eight serial dilutions of 1:2. PBMCs were activated with IL-2 (1000 U/ml)/R848 (2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) for 5 d. Cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 48 h to allow sufficient Ab deposition to occur. After the incubation, cells were washed away with 200  $\mu$ l PBS-T 0.05% three times with a final PBS rinse. All four OptiPrep-purified DENV serotypes were plated at a final concentration of 1  $\mu$ g/serotype/well for 1 h at 37°C. After the DENV incubation, wells were washed three times with 200  $\mu$ l PBS-T 0.05%, with a final PBS rinse. The four Qdot-conjugated, serotype-specific mAbs (50  $\mu$ l/well at a 1  $\mu$ g/ml final concentration for each detection mAb) were added to each well and incubated for 1 h at 37°C. Finally, the plate was washed two to three times with PBS and once with double-distilled H<sub>2</sub>O and dried using a 96-well MultiScreen Vacuum Manifold (Millipore). Visualization of the fluorescent spots was performed using a CTL ImmunoSpot S6 Micro-Analyzer (Cellular Technology Limited). Specifically, four different emission filters are used, each designated to one serotype. Each emission filter, and therefore serotype, is read by the CTL reader individually, and a merged picture is generated that is the combination of all four images. The software that is installed in the reader counts the spots for each filter/serotype individually. Subsequently, the software identifies the spots that are found in one filter (type-specific) or more than one filter (bi-, tri-, or tetra-serotype specific) through pixel colocalization. To control for background, two negative controls were used. First, stimulated PBMCs from each DENV-positive Nicaraguan sample were processed as above; however, after PBMC incubation and Ab deposition through IgG binding, Qdot-conjugated serotype-specific detection mAbs were added directly without the DENV Ag incubation step. In all cases, no reactivity (background) was observed. In addition, stimulated PBMCs from DENV-negative Oakland Blood Bank donors were used as a negative (background) control. In this instance, the complete QCF procedure was followed, including incubation with DENV Ag. However, because the donors were DENV negative, this control also showed no reactivity.

To determine total IgG-secreting cells, PBMCs were plated in 1:2 serial dilutions of the untreated (ex vivo) or stimulated (in vitro) cells

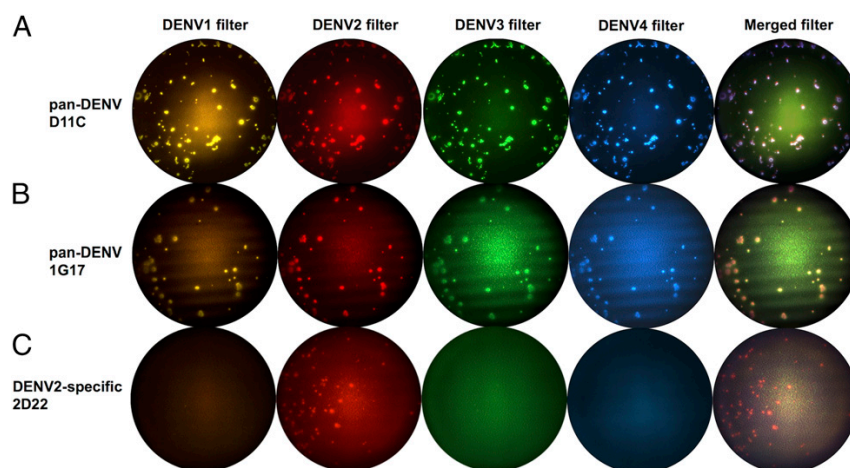
starting from 60,000 PBMCs/well. Wells were coated with anti-human IgG (Fc-specific) Ab. Following cell incubation and Ab deposition, IgG-positive spots were visualized using a polyclonal PE-labeled anti-human IgG detection mAb (H+L). Spots were then counted using the CTL reader.

## Results

### Modification of the conventional ELISPOT

The QCF is a modified version of an ELISPOT that uses purified virus from all four DENV serotypes and fluorophore-linked serotype-specific mAbs to identify to which DENV serotype(s) Abs from Ab-secreting cells (ASCs) bind. Flipping the configuration of the assay from Ag coated on the plate followed by detection of captured Abs (conventional ELISPOT), to the capture of Abs secreted by B cells on the plate followed by detection of Ag specificity (QCF) enables determination of serotype-specificity on a single-cell basis, rather than only at the cell-population level (Fig. 1A). Specifically, eight serial 1:2 dilutions of ASCs consisting of either EBV-transformed B cells/hybridomas ( $1 \times 10^3$  in the first well) or activated PBMCs from dengue patients or DENV-immune blood-bank donors ( $1 \times 10^6$  stimulated PBMCs) are incubated for 48 h in a sterile IPFL clear 96-well plate that has been activated, bound with anti-human Fc-specific IgG, and blocked. This captures ASC-secreted Abs, after which the cells are removed via washes. The wells are then incubated with purified virions from all four serotypes in equal concentration (1  $\mu$ g/serotype/well). Spot specificity is determined by the addition of fluorophore-linked serotype-specific detection mAbs. Excess Ab is removed, and spots are visualized on a fluorescent ELISPOT reader.

Several key technical considerations of this assay are as follows. First, the Ab on the plate membrane used to capture the Abs secreted by ASCs is an Fc-specific anti-human IgG that binds the Fc region of the secreted Ab, leaving its V region accessible for binding virus. Second, equal amounts of each Ag (purified DENV) are used to allow binding to the captured Ab. Third, a majority of the Ab response is directed against the surface of the DENV virion—envelope (E) and premembrane, and many human neutralizing Abs bind to quaternary epitopes on the assembled virion



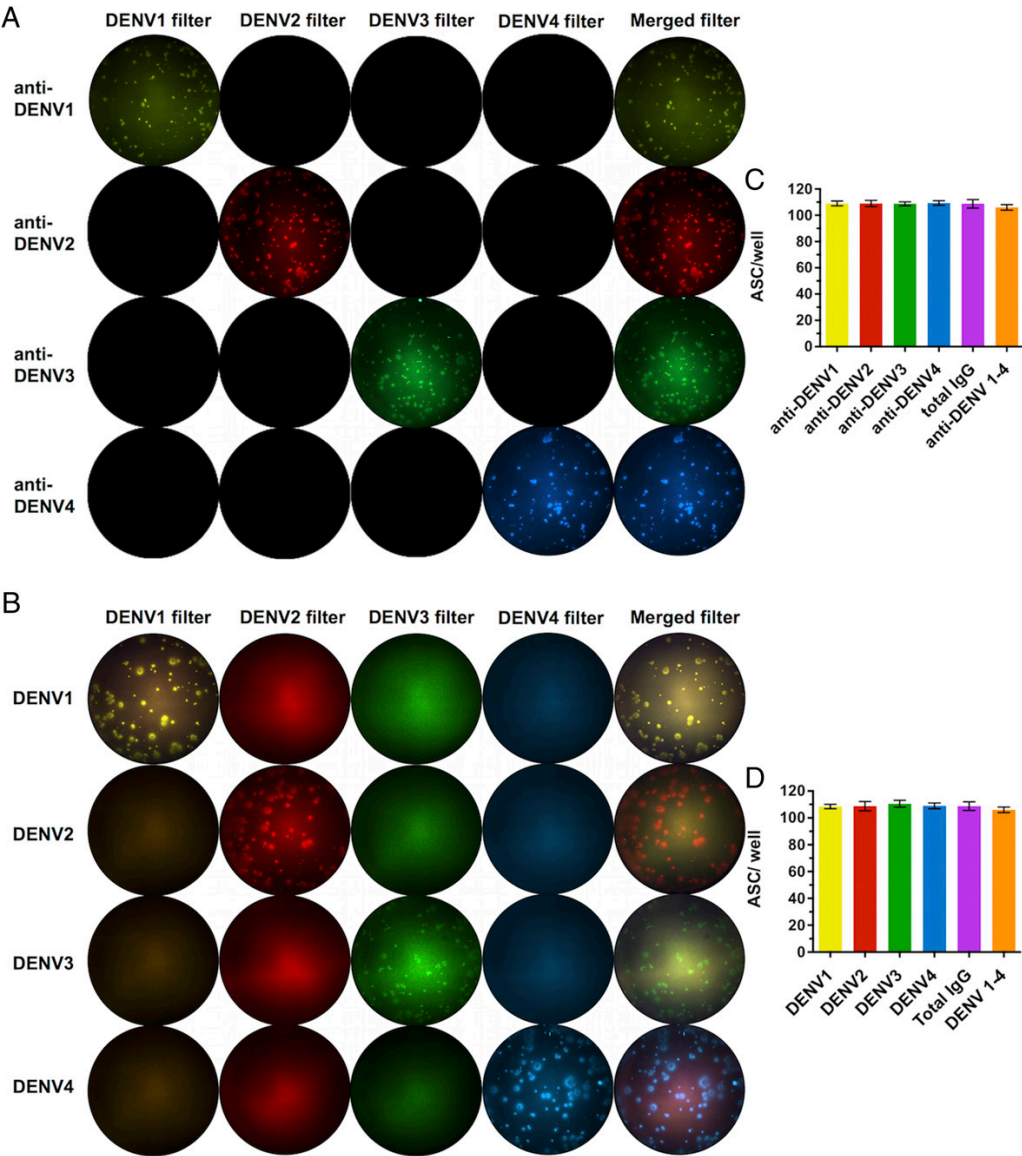
**FIGURE 2.** Detection of DENV-specific cells from human DENV serotype cross-reactive and DENV2-specific ASCs. **(A)** D11C is an EBV-transformed human DENV cross-reactive B cell line and was used as the ASC in the QCF. Four filters were used for detection by a CTL Analyzer, each specific to the Qdot conjugated to the serotype-specific mAbs. The merged filters show the serotype-cross-reactivity of D11C. **(B)** Serotype-cross-reactive ASCs were detected via QCF using the human hybridoma 1G17. The figure shows detection of ASC reactivity to each DENV serotype, and the merged image shows the cross-reactivity of all the ASCs. **(C)** Serotype-specific ASCs were detected using 2D22, a human DENV2-specific hybridoma. The single filters of each serotype and the merged filters show reactivity only with DENV2.



that are not found on recombinant monomeric E (7, 13, 14). Furthermore, using virions instead of recombinant E increases the brightness of the spots due to amplification (up to 180 E protein epitopes per virion, with occupancy determined by each mAb) (15). DENV was propagated in *A. albopictus* cells (C6/36) and purified via a discontinuous OptiPrep density gradient (16). SDS-PAGE and Coomassie blue staining confirmed the purity of the DENV serotype preparations (Supplemental Fig. 1), and total protein concentration for each batch of Ag was measured by bicinchoninic acid (BCA) (Fig. 1B). By using equal in-excess protein concentrations of the four DENV virions, the Ag specificity of the ASCs is determined by the affinity and avidity of the Ab secreted without bias toward any DENV serotype.

Optimization of the DENV QCF

We initially tried to visualize DENV-specific spots by direct or indirect fluorescent labeling of the captured DENV. Directly labeling the purified DENV with protein-amine binding dyes (e.g., Alexa Fluor) or membrane dyes (e.g., DiO, DiI) was not bright enough for visualization in the QCF (data not shown). Therefore, we screened by ELISA a panel of mAbs to identify those with serotype-specific reactivity. Three murine mAbs, all binding E domain III (anti-DENV1 E95, anti-DENV2 E96, and anti-DENV4 E88) (17–19) and one human E domain I/II-directed mAb (anti-DENV3 5J7) (14, 20), were selected. The epitopes targeted are maturation insensitive; thus, the maturation state of the virion should not affect binding of the detection mAbs (20, 21). The



**FIGURE 3.** Analysis of single DENV serotypes or detection mAbs. **(A)** Captured Abs secreted by D11C were incubated with all four DENV serotypes and detected using each individual serotype-specific mAb separately. **(B)** Conversely, Abs secreted by D11C were incubated with a single DENV serotype per well and detected with all four serotype-specific mAbs. **(C and D)** Spots were enumerated and compared with the total number of IgG-secreting cells and the number of spots detected when all four serotypes and four mAbs were used simultaneously. No significant differences were observed, as determined using the Friedman test.

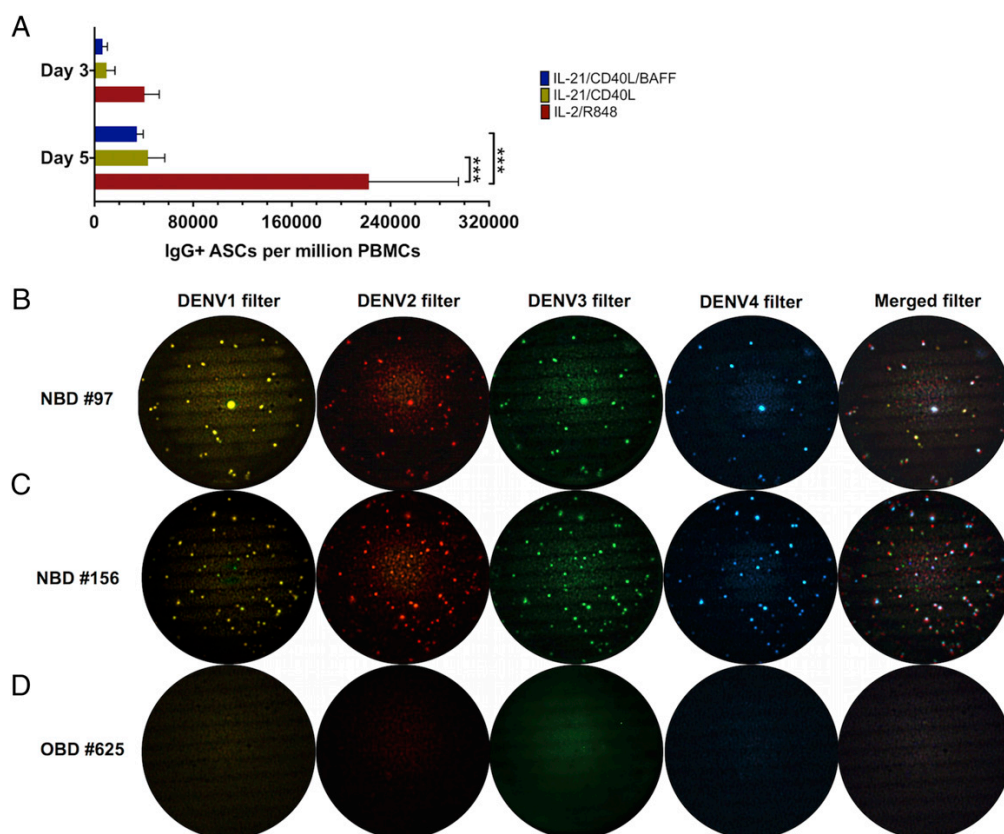
serotype specificity of each Ab was assessed by ELISA and flow cytometry, confirming no cross-reactivity between the different DENV serotypes (Fig. 1C). Qdots (22) are tunable nanocrystals (10–30 nm) for which fluorescent properties can be altered by size modification. Their bright fluorescence and minimal spectral overlap made Qdots an attractive candidate for the QCF, so the four serotype-specific mAbs were conjugated to four distinct Qdots (Supplemental Fig. 2).

To assess the ability of the QCF to distinguish the ASC serotype specificity, we first used a human serotype-specific anti-DENV2 hybridoma (mAb 2D22) and human cross-reactive pan-DENV EBV-transformed B cells or hybridomas (mAbs D11C and 1G17). When incubated with the four DENV virions and all four serotype-specific detection mAbs, the QCF distinguished between serotype-specific and cross-reactive ASCs (Fig. 2). To rule out steric hindrance or interference among the four detecting mAbs when used simultaneously, captured Abs secreted by ASCs (pan-DENV D11C) were incubated with all four DENV serotypes and detected using each individual serotype-specific detection mAb separately (Fig. 3A). Conversely, to determine whether addition of four viruses simultaneously hindered determination of the specificity of the ASCs, captured Abs were incubated with a single DENV serotype per well and detected with all four serotype-

specific detection mAbs (Fig. 3B). Testing parallel wells plated with equivalent numbers of cells, the number of spots detected with either the four DENV serotypes separately or four individual detection mAbs was comparable to the total number of IgG-secreting cells and to the number of spots detected when all four serotypes and four mAbs were used simultaneously (Fig. 3C, 3D). Thus, inclusion of all four DENV serotypes and all four serotype-specific mAbs in a single well did not interfere with the sensitivity or serotype-specificity of the assay.

#### Detection of DENV serotype-specific and cross-reactive responses in stimulated human PBMCs

We first sought to determine optimal stimulation conditions to activate MBCs into ASCs. PBMCs from six different donors from the Nicaraguan National Blood Center were stimulated under three different conditions: 1) CD40L/IL-21/BAFF; 2) CD40L/IL-21; and 3) IL-2/R848 for either 3 or 5 d in vitro. Following stimulation, the total number of IgG-secreting cells was evaluated via FluoroSpot. Five days of in vitro stimulation with IL-2/R848 consistently yielded the highest number of IgG-positive ASCs in every donor (Fig. 4A). We then evaluated the ability of the QCF to determine DENV-specific responses from DENV-exposed or DENV-naïve blood donors from Nicaragua or California, respectively. PBMCs



**FIGURE 4.** DENV-specific responses in DENV-exposed and DENV-naïve blood bank donors. **(A)** Optimization of MBC stimulation. PBMCs from Nicaraguan blood bank donors ( $n = 6$ ) were activated, and the number of IgG<sup>+</sup> spots per million activated PBMCs was measured. CD40L feeder cells/IL-21 (100 ng/ml), CD40L feeder cells/IL-21 (100 ng/ml)/BAFF (100 ng/ml), or IL-2 (1000 U/ml)/R848 (2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) were used for activation. Two-way repeated-measures ANOVA revealed a significant difference between the number of IgG<sup>+</sup> ASCs obtained in each condition. Bonferroni posttest determined significant pairwise comparisons.  $***p < 0.001$ . PBMCs from DENV-exposed Nicaraguan blood bank donors (NBD #97 and #156) **(B and C)** and a DENV-negative blood bank donor from the Oakland Red Cross (OBD #625) **(D)** were stimulated with IL-2 (1000 U/ml)/R848 (2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) for 5 d in vitro. PMBCs were plated in serial 1:2 dilutions starting from  $1 \times 10^6$  cells. Stimulation was confirmed by IgG<sup>+</sup> detection (data not shown). The QCF result shows DENV-specific spots in Nicaraguan blood donors **(B and C)** and no DENV reactivity in the DENV-naïve blood donor **(D)**.



from blood bank donors were stimulated for 5 d with IL-2 and R848 and analyzed by QCF. Both serotype-specific and cross-reactive MBCs were observed in the MBC population from DENV-exposed blood donors (Fig. 4B, 4C), whereas no DENV-reactive spots were seen in the DENV-naïve control (Fig. 4D).

We next sought to assess whether the QCF could be used to detect MBC and PB/PC responses in primary human PBMCs from DENV-infected individuals during either acute- or convalescent-phase time points in participants in our Hospital-based Dengue Study in Nicaragua (11, 23). PBMCs from a DENV-positive patient (secondary DENV3) were plated directly ex vivo and assessed via QCF to determine the PB/PC response. Cells were serially diluted as above, and DENV-specific ASCs were detected with the four DENV serotypes and four DENV serotype-specific detection mAbs. The Nicaraguan PB/PCs ex vivo were serotype cross-reactive (Fig. 5A). Next, convalescent PBMCs from a patient with primary DENV3 infection, a patient with secondary DENV3 infection, and a DENV-negative blood bank donor from Oakland as a negative control were stimulated in vitro with IL-2/R848 for 5 d and analyzed via QCF. MBCs from the primary convalescent sample revealed a predominantly serotype-specific response against DENV3 (Fig. 5B), consistent with previous reports (10), whereas the secondary convalescent sample displayed more serotype cross-reactive MBCs (Fig. 5C). The number of B cells specific for one, two, three, or four DENV serotypes was enumerated (Fig. 5). The DENV-negative control displayed no B cell reactivity to DENV (data not shown).

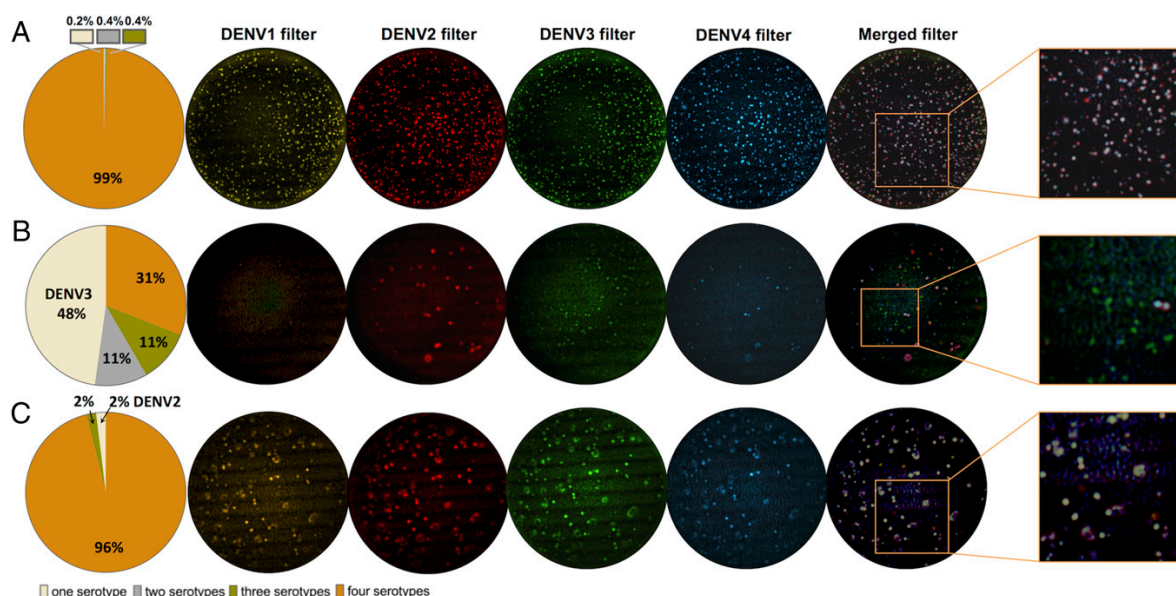
## Discussion

We have developed a novel modification of the conventional ELISPOT, the QCF, to detect DENV serotype-specific and cross-reactive B cell responses on a single-cell basis. Using DENV-specific human EBV-transformed B cells, we showed that visualization of ASCs with all four DENV viruses and all four

DENV-specific mAbs was as sensitive as detection with a single virus or a single detection mAb. Furthermore, the QCF was able to quantify serotype-specific and cross-reactive single B cells from the PBMCs of DENV-exposed blood donors and DENV-infected patients, in both PB/PCs and MBCs.

The correlates of protection against DENV infection and/or severe disease are not well understood, but are thought to be associated with a strongly neutralizing Ab response. However, infection with one DENV serotype imparts long-term protection against reinfection with the same serotype but not against infection from heterologous serotypes, and secondary infection with a different serotype increases the risk for developing severe disease, thought to be due at least in part to Ab-dependent enhancement (24). Recent studies have provided valuable information about MBC specificity at a B cell population level by conventional ELISPOT (10, 11) and by using human mAbs generated from DENV-exposed individuals (4, 5, 7, 14). Although informative, these studies have not addressed how Ab and MBC serotype-specific or cross-reactive responses develop over time and mature after primary or secondary natural DENV infection on a single-cell basis. It is critical to understand how the MBC response evolves and what constitutes immune correlates of protection in natural DENV infections. Thus, it is imperative to better understand B cell and Ab responses to natural DENV infections, which will in turn facilitate evaluation of vaccine candidates in clinical trials. The QCF technology will enable an in-depth analysis of the generation and evolution of the specificity of B cell responses in primary and secondary DENV infections as well as vaccinees and will permit B cell serotype specificity or cross-reactivity to be evaluated as a potential immune correlate of protection in natural DENV infections and in trials of candidate dengue vaccines.

Finally, the QCF can be adapted to assess other diseases in which identifying the serotype- or subtype-specific B cell response is



**FIGURE 5.** Quantification of DENV serotype-specific and cross-reactive responses from DENV-infected patients. (A) Acute-phase PBMCs from an acute secondary DENV3 case were isolated and analyzed ex vivo without stimulation. A total of 207,294 DENV-specific PBs was calculated per  $10^6$  PBMCs. (B) PBMCs from a primary DENV3 case collected at convalescence (~14 d postsymptom onset) were stimulated in vitro with IL-2 (1000 U/ml)/R848 (2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) for 5 d and then analyzed via QCF. A total of 8,800 DENV-specific MBCs was enumerated per  $10^6$  cells. (C) Convalescent PBMCs from the same secondary DENV3 case as in (A) were stimulated in vitro as above and analyzed via QCF. A total of 99,162 DENV-specific MBCs was calculated per  $10^6$  cells.

paramount. In addition to DENV, other infections such as influenza (25), HIV (26, 27), and severe acute respiratory syndrome-coronavirus (28) have been reported to generate Ag-specific Ab responses that can enhance infection and disease progression. In the case of HIV and influenza, it has been hypothesized that vaccination with the wrong virus could lead to enhanced infection within the vaccinated population (26). Thus, understanding the specificity and cross-reactivity of B cells generated by a vaccination protocol against different viral subpopulations could be vital to predicting vaccination safety and efficacy; the QCF is a tool that could be used to facilitate this analysis.

## Acknowledgments

We thank Michael S. Diamond (Washington University, St. Louis, MO) for mAbs E88, E95, and E96 and the CD40L-producing cell line; John S. Schieffelin (Tulane University) for D11C EBV-transformed B cells; and James Crowe (Vanderbilt University) for the 2D22 and 1G17 hybridomas and 5J7 mAb. We also thank Zoltán Megyesi for image processing support and Tameem Ansari (Cellular Technology Limited) for technical support.

## Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

## References

- Bhatt, S., P. W. Gething, O. J. Brady, J. P. Messina, A. W. Farlow, C. L. Moyes, J. M. Drake, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, O. Sankoh, et al. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504–507.
- Halstead, S. B. 2003. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv. Virus Res.* 60: 421–467.
- de Alwis, R., M. Beltramello, W. B. Messer, S. Sukupolvi-Petty, W. M. Wahala, A. Kraus, N. P. Olivarez, Q. Pham, J. D. Brien, W. Y. Tsai, et al. 2011. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. [Published erratum appears in 2011 *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: 8.] *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: e1188.
- Smith, S. A., Y. Zhou, N. P. Olivarez, A. H. Broadwater, A. M. de Silva, and J. E. Crowe, Jr. 2012. Persistence of circulating memory B cell clones with potential for dengue virus disease enhancement for decades following infection. *J. Virol.* 86: 2665–2675.
- Beltramello, M., K. L. Williams, C. P. Simmons, A. Macagno, L. Simonelli, N. T. Quyen, S. Sukupolvi-Petty, E. Navarro-Sanchez, P. R. Young, A. M. de Silva, et al. 2010. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe* 8: 271–283.
- Smith, S. A., R. de Alwis, N. Kose, A. P. Durbin, S. S. Whitehead, A. M. de Silva, and J. E. Crowe, Jr. 2013. Human monoclonal antibodies derived from memory B cells following live attenuated dengue virus vaccination or natural infection exhibit similar characteristics. *J. Infect. Dis.* 207: 1898–1908.
- Dejnirattisai, W., W. Wongwiwat, S. Supasa, X. Zhang, X. Dai, A. Rouvinsky, A. Jumnainsong, C. Edwards, N. Than Ha Quyen, T. Duangchinda, et al. 2015. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nat. Immunol.* 16: 170–177.
- Wrammert, J., N. Onlamoon, R. S. Akondy, G. C. Perng, K. Polsrila, A. Chandele, M. Kwissa, B. Pulendran, P. C. Wilson, O. Wittawatmongkol, et al. 2012. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans. *J. Virol.* 86: 2911–2918.
- Garcia-Bates, T. M., M. T. Cordeiro, E. J. Nascimento, A. P. Smith, K. M. Soares de Melo, S. P. McBurney, J. D. Evans, E. T. Marques, Jr., and S. M. Barratt-Boyes. 2013. Association between magnitude of the virus-specific plasmablast response and disease severity in dengue patients. *J. Immunol.* 190: 80–87.
- Mathew, A., K. West, S. Kalayanaraj, R. V. Gibbons, A. Srikiatkachorn, S. Green, D. Libraty, S. Jaiswal, and A. L. Rothman. 2011. B-cell responses during primary and secondary dengue virus infections in humans. *J. Infect. Dis.* 204: 1514–1522.
- Zompi, S., M. Montoya, M. O. Pohl, A. Balmaseda, and E. Harris. 2012. Dominant cross-reactive B cell response during secondary acute dengue virus infection in humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: e1568.
- Dejnirattisai, W., A. Jumnainsong, N. Onsirakul, P. Fitton, S. Vasanawathana, W. Limpitkul, C. Puttikunt, C. Edwards, T. Duangchinda, S. Supasa, et al. 2010. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 328: 745–748.
- Teoh, E. P., P. Kukkaro, E. W. Teo, A. P. Lim, T. T. Tan, A. Yip, W. Schul, M. Aung, V. A. Kostyuchenko, Y. S. Leo, et al. 2012. The structural basis for serotype-specific neutralization of dengue virus by a human antibody. *Sci. Transl. Med.* 4: 139ra83.
- de Alwis, R., S. A. Smith, N. P. Olivarez, W. B. Messer, J. P. Huynh, W. M. Wahala, L. J. White, M. S. Diamond, R. S. Baric, J. E. Crowe, Jr., and A. M. de Silva. 2012. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 7439–7444.
- Diamond, M. S., T. C. Pierson, and D. H. Fremont. 2008. The structural immunology of antibody protection against West Nile virus. *Immunol. Rev.* 225: 212–225.
- Zybert, I. A., H. van der Ende-Metselaar, J. Wilschut, and J. M. Smit. 2008. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J. Gen. Virol.* 89: 3047–3051.
- Sukupolvi-Petty, S., S. K. Austin, M. Engle, J. D. Brien, K. A. Dowd, K. L. Williams, S. Johnson, R. Rico-Hesse, E. Harris, T. C. Pierson, et al. 2010. Structure and function analysis of therapeutic monoclonal antibodies against dengue virus type 2. *J. Virol.* 84: 9227–9239.
- Sukupolvi-Petty, S., J. D. Brien, S. K. Austin, B. Shrestha, S. Swayne, K. Kahle, B. J. Doranz, S. Johnson, T. C. Pierson, D. H. Fremont, and M. S. Diamond. 2013. Functional analysis of antibodies against dengue virus type 4 reveals strain-dependent epitope exposure that impacts neutralization and protection. *J. Virol.* 87: 8826–8842.
- Shrestha, B., J. D. Brien, S. Sukupolvi-Petty, S. K. Austin, M. A. Edeling, T. Kim, K. M. O'Brien, C. A. Nelson, S. Johnson, D. H. Fremont, and M. S. Diamond. 2010. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog.* 6: e1000823.
- Fibriansah, G., J. L. Tan, S. A. Smith, R. de Alwis, T. S. Ng, V. A. Kostyuchenko, R. S. Jadi, P. Kukkaro, A. M. de Silva, J. E. Crowe, and S. M. Lok. 2015. A highly potent human antibody neutralizes dengue virus serotype 3 by binding across three surface proteins. *Nat. Commun.* 6: 6341.
- Pierson, T. C., and M. S. Diamond. 2012. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.* 2: 168–175.
- Bera, D., L. Qian, T.-K. Tseng, and P. H. Holloway. 2010. Quantum dots and their multimodal applications: A review. *Materials (Basel)* 3: 2260–2345.
- Narvaez, F., G. Gutierrez, M. A. Pérez, D. Elizondo, A. Nuñez, A. Balmaseda, and E. Harris. 2011. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: e1397.
- Guzman, M. G., M. Alvarez, and S. B. Halstead. 2013. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch. Virol.* 158: 1445–1459.
- Tamura, M., R. G. Webster, and F. A. Ennis. 1994. Subtype cross-reactive, infection-enhancing antibody responses to influenza A viruses. *J. Virol.* 68: 3499–3504.
- Burke, D. S. 1992. Human HIV vaccine trials: does antibody-dependent enhancement pose a genuine risk? *Perspect. Biol. Med.* 35: 511–530.
- Robinson, W. E., Jr., D. C. Montefiori, W. M. Mitchell, A. M. Prince, H. J. Alter, G. R. Dreesman, and J. W. Eichberg. 1989. Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in vitro by serum from HIV-1-infected and passively immunized chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4710–4714.
- Yip, M. S., N. H. Leung, C. Y. Cheung, P. H. Li, H. H. Lee, M. Daëron, J. S. Peiris, R. Bruzzone, and M. Jaume. 2014. Antibody-dependent infection of human macrophages by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Virol. J.* 11: 82.

---

## 5. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades **Dr. med.**

Titel:

Quad-Color-FluoroSpot, das Verfahren zur umfassenden Analyse der Kreuzreaktivität DENV-spezifischer B-Zellen auf Einzelzellbasis

eingereicht von:

Alexandros Hadjilaou

angefertigt am:

Institut für Virologie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

betreut von:

Prof. Dr. med. Christian Jassoy, Universität Leipzig, Deutschland.

Prof. Eva Harris PhD, University of California, Berkeley, USA.

eingereicht am **29. September 2015**

Das Denguefieber ist weltweit die häufigste virale, durch Mücken übertragene Infektionskrankheit. Jährlich stecken sich in knapp 130 tropischen bzw. subtropischen Ländern ca. 400 Millionen Menschen durch Dengue-Virus-infizierte Tigermücken (*Aedes* spp.) an, wobei nur jeder fünfte Infizierte symptomatisch wird. Ungefähr eine halbe Million Menschen mit symptomatischem Denguefieber entwickeln jährlich eine schwere klinische Symptomatik. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation zufolge endet die Erkrankung bei jeder zweiten, an schwerem Denguefieber erkrankten Person, welche nicht intensivmedizinisch betreut wird, tödlich.

Das Denguefieber, welches häufig durch einen milden, grippeähnlichen, selbstlimitierenden Krankheitsverlauf gekennzeichnet ist, kann in einen schweren übergehen, was aufgrund der erhöhten Blutungsneigung lebensbedrohlich sein kann. Obwohl die genauen Mechanismen, die zum schweren Verlauf des Denguefiebers führen, nicht vollständig geklärt sind, steht fest, dass eine zweite Infektion mit dem Dengue-Virus mit einem erhöhten Risiko eines schweren klinischen Verlaufs einhergeht. Es existieren vier unterschiedliche Serotypen des Dengue-Virus (DENV 1-4), wobei die zweite Infektion, die durch einen anderen DENV-Serotyp als bei der Erstinfektion verursacht wurde, riskanter ist. Das lässt sich auf infektionsverstärkende Antikörper zurückzuführen, welche wegen schwacher bzw. fehlender Neutralisation zur erhöhten Zellinfektivität durch eine erleichterte,

virale Internalisation führen. Dieser als ADE (antibody dependent enhancement) bezeichnete Mechanismus stellt eine der größten Herausforderung für die Herstellung eines Dengue-Impfstoffs dar, welcher eine ausreichende Immunität gegen alle vier DENV-Serotypen bieten soll.

Aus diesem Grund ist die Analyse und Beschreibung der Frequenz antikörperproduzierender Zellen DENV-Infizierter bzw. -Geimpfter auf Populations- aber auch insbesondere auf Einzelzellebene wichtig. Die bis dato verfügbaren Verfahren, welche eine entsprechende Analyse der Spezifität ermöglichen, sind aufgrund diverser technischer Einschränkungen unzureichend für die Analyse der Kreuzreaktivität.

In dieser Promotionsarbeit wird der Quad-Color FluoroSpot (QCF) vorgestellt, welcher die Bestimmung der Frequenz von DENV-Serotyp-spezifischen und DENV-Serotyp-kreuzreaktiven B-Zellen auf Einzelzellbasis ermöglicht. Das vorgestellte Verfahren erlaubt die umfassende Analyse der spezifischen B-Zellantwort, so wie sie sich während einer primären oder sekundären DENV-Infektion bzw. nach einer Dengueimpfung entwickelt. Außerdem ermöglicht der QCF die Beurteilung, ob die DENV-Serotypspezifität bzw. -kreuzreaktivität von B-Zellen als Surrogatmarker für Immunschutz bei DENV-Infizierten bzw. in Studien, welche Dengueimpfstoffkandidaten testen, relevant ist. Außerdem kann das Verfahren durch die Anpassung des verwendeten Antigens auch zur Beurteilung der B-Zellantwort, so wie sie sich nach einer Infektion mit anderen Erregern wie HIV oder Influenzavirus entwickelt, Anwendung finden.

---

## 6. Selbständigkeitserklärung

### **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift

## 8. Danksagung

Obwohl das erklärte Ziel einer Dissertation der Nachweis zur Fähigkeit selbständiger wissenschaftlicher Arbeit ist, wäre die vorliegende Promotionsarbeit in dieser Form als Werk einer einzelnen Person nicht denkbar. Deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir bei der Erstellung meiner Dissertation Unterstützung und Rückendeckung gegeben haben.

Frau Prof. Eva Harris hat es mir zwei Jahre lang ermöglicht, meine wissenschaftliche Ideen und Überlegungen in die Praxis umsetzen zu können. Durch Ihre jahrelange Expertise im Bereich Dengue hat sie mich sicher und akribisch durch mein experimentelles Vorgehen und abschließend beim Verfassen der Publikation betreut. Den initialen Kontakt zur wissenschaftlichen Arbeit habe ich Herrn Prof. Dr. med. Christian Jassoy zu verdanken, der mir bei der Suche nach einem Promotionsprojekt geholfen hat und mir jederzeit für konstruktive Gespräche zur Verfügung stand.

Außerdem möchte ich ausdrücklich Dr. rer. nat. Sven Reiche und Frau Katrin Bräutigam danken, die mir fürsorglich zahlreiche wissenschaftliche Methoden beigebracht haben. Des Weiteren danke ich meinen Betreuern und Gutachtern, die mir in den Jahren der Promotion mit wichtigen Ratschlägen behilflich waren und mein Vorhaben maßgeblich unterstützt haben. Ohne die Unterstützung von Prof. Michael S. Diamond, Prof. James Crowe und Dr. John S. Schieffelin mit DENV-spezifischen Hybridomen und monoklonalen Antikörpern wäre meine Promotion so in ihrer Form nicht möglich. Die Promotionsarbeit wäre außerdem ohne die technische Hilfe und Betreuung von Tameem Ansari und Zoltan Megyesi nicht machbar.

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Mitgliedern des Fachschaftsrates der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig bedanken. Erst durch das Promotionsstipendium der Fakultät sind meine Bemühungen fruchtbar gewesen. Meinen wissenschaftlichen Kollegen der Abteilung für Infektionskrankheiten und Impfstoffforschung der Universität von Kalifornien, Berkeley, danke ich für die immer zielführenden Diskussionen, die so manche thematische Wende in meine Dissertation brachten; darunter Angela M. Green, Dr. Josefina Coloma, Dr. Henry N. Puerta, Dr. rer. nat. Michael A. Schmidt, Sara A. Watson, Magelda M. Cruz, Paulina Andrade und Maria Jose Vargas Davila.

Die Neugier, das Interesse und die Faszination meines Großvaters, Dr. med. habil. Manfred Scholbach, für wissenschaftliche Themen erkenne ich in mir wieder. Seine anatomischen Kenntnisse und unsere wöchentlichen Diskussionen, die wir gemeinsam mit meiner Großmutter, Dr. med. Lilli Scholbach, führten, haben mich motivierend durch das Medizinstudium begleitet.

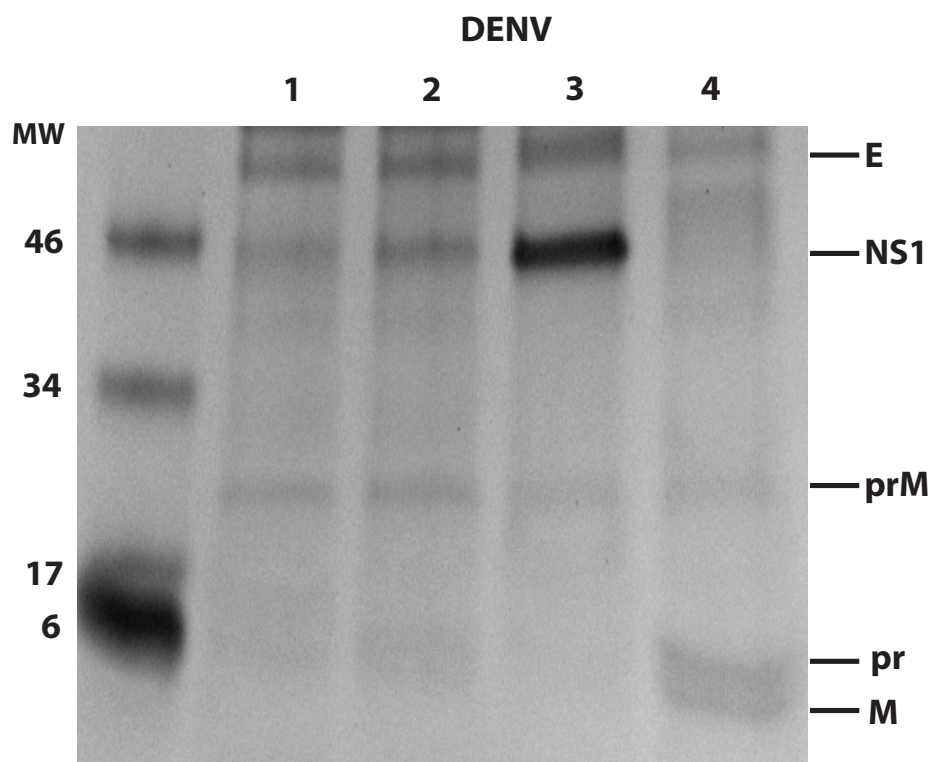
---

Zu guter Letzt haben meine Eltern, Melitta und Christakis, die vergangenen Jahre dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht. Sie standen mir nicht nur emotional und finanziell bei, sondern haben mein Weltbild u.a. auch durch meine bi- bzw. trilinguale Erziehung maßgeblich geprägt. Obwohl der mazedonische König, Alexander der Große, mit dem Spruch „Meinen Eltern verdanke ich das Leben und meinem Lehrer das gute Leben“ zwischen Eltern und Lehrer differenzierte, kann ich stolz und mit Gewissheit sagen, dass meine Eltern mir das Leben geschenkt und mich außerdem vieles über und für das Leben gelehrt haben. Ihnen gilt mein besonderer Dank.

Alexandros Hadjilaou  
September 2015

## 9. Anlagen

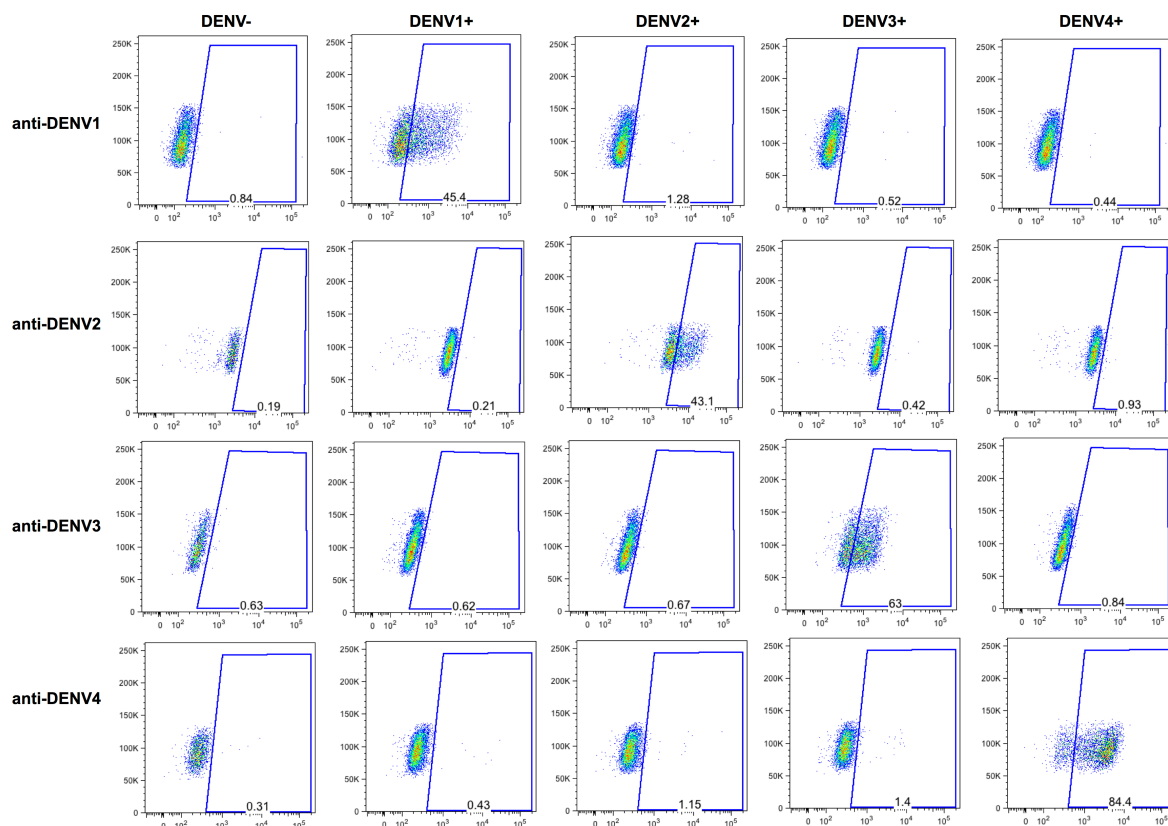
### 9.1. Ergänzende Abbildungen zur Publikation



#### **SUPPLEMENTAL FIGURE 1. Analysis of purified DENV stocks by SDS-PAGE.**

DENV 1-4 virus preparations were purified on a discontinuous OptiPrep gradient and evaluated for purity on an 4-20% SDS-PAGE gradient gel. Five  $\mu\text{g}$  of total protein for each virus were loaded per well, and proteins were visualized by Coomassie Blue staining. MW, molecular weight markers.





**SUPPLEMENTAL FIGURE 2. Flow cytometry of Qdot-conjugated detection Mabs.** Raji cells, stably transfected to express DC-SIGN, an attachment factor for DENV infection, were infected with the four DENV serotypes (DENV1 N1265-04, DENV2 N172-06, DENV3 N2845.6-09 and DENV4 N703-99) at a multiplicity of infection (MOI) of 2 for 48 hours. Cells were fixed with 2% PFA and permeabilized with 0.2% saponin. Permeabilized cells were stained with the Qdot-conjugated detection MABs in 1% NMS or NHS at a 1:100 dilution and analyzed on a BD LSRFortessa flow cytometer. Analysis was performed using FlowJo 8.8.7 software (TreeStar).